

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİT C VİRUS ZARF GLİKOPROTEİNİNİN SAFLAŞTIRILARAK ELDE EDİLMESİ

ÖZGE ÖZTUNA

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR – 2012

TEZ KODU: DEU.HSL.MSC-2008970026

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİT C VİRUS ZARF GLİKOPROTEİNİNİN SAFLAŞTIRILARAK ELDE EDİLMESİ

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

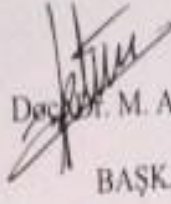
YÜKSEK LİSANS TEZİ

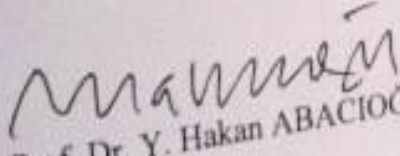
ÖZGE ÖZTUNA

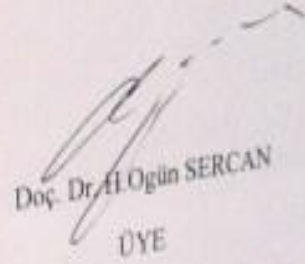
Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. İ.M.ALİ ÖKTEM

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2008970026

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Özge ÖZTUNA 'Hepatit C
Virus Zarflıkoproteininin Saflaştırılarak Elde Edilmesi' konulu yüksek lisans tezini
03.07.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Doç. Dr. M. Ali ÖKTEM
BAŞKAN


Prof. Dr. Y. Hakan ABACIOĞLU
ÜYE


Doç. Dr. H. Ogün SERCAN
ÜYE

Doç. Dr. Bekir ERGÜR
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Alpay ÖZBEK
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
TABLO DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Hepatit C Virüs.....	7
2.1.1. Tarihçe, sınıflandırma ve genom yapısı	7
2.1.2. Epidemiyolojisi	9
2.1.3. HCV tanısı.....	10
2.1.3.1. Serolojik testler	10
2.1.3.2. Nükleik asid testleri	11
2.1.3.3.Genotiplleme testleri	12
2.1.4. HCV Sağaltım ve Koruma.....	13
2.1.5. Viral Proteinlerinin Özellikleri	13
2.1.5.1. Core(özyapı) proteini	13
2.1.5.2. E1 ve E2 zarf proteinleri	13
2.1.5.3. P7 proteini	14
2.1.5.4. NS2 proteini	15
2.1.5.5. NS3 proteini	15
2.1.5.6. NS4A proteini	15
2.1.5.7. NS4B proteini.....	15
2.1.5.8. NS5A proteini	16
2.1.5.9. NS5B proteini.....	16
2.2. Hepatit C Virüs yaşam döngüsü	17
2.3. Gen Klonlama	18
2.3.1 . Klonlama Yöntemleri	18
2.3.2. DNA ligasyonu.....	18

2.3.3 Transformasyon.....	19
2.3.4. Kolonilerin seçimi.....	19
2.3.5. Rekombinant genin klonlandığı hücrelerin saptanması.....	19
2.4. Protein ekspresyonu.....	19
2.4.1 Ekspresyon Vektörleri.....	19
2.4.2. Protein ekspresyonunun gösterilmesi.....	20
2.5. HCV zarf glikoproteinlerin biyogenezi.....	21
2.6. Olgun Hcv Zarf Glikoproteinlerinin Karakterizasyonu.....	21
2.7. HCV hücreye giriş boyunca zarf proteinlerinin rolü	23
2.8 Virüs yaşam döngüsü ve replikasyonunda E1 proteininin potansiyel rolü.....	26
2.9. ER zarfı ve protein translokasyonu.....	26
2.10. Tanıda E1 spesifik mAbs kullanılması.....	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Araştırmanın Tipi.....	28
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	28
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	28
3.4. Çalışma Materyali.....	28
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	28
3.6. Veri Toplama Araçları.....	28
3.6.1. Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri.....	28
3.6.2. Bakteri suşları ve ekspresyon vektörleri:.....	35
3.6.3. Hepatit C virusuna ait klonlanacak DNA'nın eldesi.....	35
3.6.3.1. cDNA sentezi.....	35
3.6.3.2. E1 proteinini için öncül tasarımı	36
3.6.3.3. E1 kesik proteinini için öncül tasarımı.....	37
3.6.3.4. Protein kodlayan gen bölgesinin iç içe PZT ile çoğaltılması.....	37
3.6.4. pQE30 vektörünün saflaştırılması.....	39
3.6.5. Restriksiyon enzimleri ile kesim.....	40
3.6.6. Ligasyon.....	41
3.6.7. M15 kompetan Escherichia coli hücrelerinin hazırlanması.....	41
3.6.7.1. M15 kompetan Escherichia coli hücrelerinin ligasyon ürünü ile transformasyonu.....	42
3.6.7.2. İnsert içeren kolonilerin seçimi	42
3.6.8. PZT ürünlerinin dizi analizi.....	43

3.6.9. Proteinlerin ifadesi ve saflaştırılması.....	43
3.6.9.1.E1 protein için.....	43
3.6.9.2.Kesik E1 protein için.....	44
3.6.9.3. SDS-PAGE için örneklerin ve jellerin hazırlanması.....	45
3.6.9.3.1 SDS-PAGE.....	46
3.6.9.3.1.2 WESTERN BLOT.....	46
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	48
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	48
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	48
3.10. Etik Kurul Onayı.....	48
4. BULGULAR	49
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
7. KAYNAKLAR.....	63
8. EKLER.....	76
8.1. Etik Kurul Onayı.....	76
8.2. Özgeçmiş	77

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: :Hepatit C virüs araştırmasındaki köşe taşları	7
Şekil 2: Hcv genom yapısı ve proteinleri	8
Şekil 3: HCV epidemiyolojisi.....	9
Şekil 4: Serolojik testler için kullanılan HCV antijenleri	11
Şekil 5: HCV tanı algoritmi	12
Şekil 6: Hepatit C Virüs yaşam döngüsü analizi ve dendogram görüntüsü	17
Şekil 7: Fla alfa ve hepacivürüslerin karşılaştırılması	23
Şekil 8: HCV girişi	25
Şekil 9: pQE30 ekspresyon vektörü	40
Şekil 10: HCV'ne ait E1 PZT ürünü	49
Şekil 11: HCV'ne ait kesilmiş E1 PZT ürünü	50
Şekil 12 : pQE30 ve E1 in agaroz jel görüntüsü	50
Şekil 13: Transformasyon sondası üreyen kolonilerden yapılan PZT'lere ait agaroz jel görün- tüsü.....	51
Şekil 14: Transformasyon sondası üreyen kolonilerden yapılan doğrulama PZT'lere ait agaroz jel görüntüsü.....	52
Şekil 15 : E1 içeren pQE30 vektörüne ait DNA dizi analizi ve karşılık gelen aminoasit dizile- ri.....	53
Şekil 16 : Rekombinant kesik E1 ve E1 Preparatının SDS PAGE Analizi.....	54
Şekil 17 : E1 proteinlerini eksprese eden hücre lizatlarının ürünlerine ait Hasta serum anti- korları ile yapılan Western blotlama fotoğrafı.....	56

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: : HCV genotiplerinin dünyadaki dağılımı.....	10
Tablo 2: Ekspresyon vektörlerinin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları.....	20

KISALTMALAR

HCV: Hepatit C Virüs

PZT: Polimeraz Zincir Tepkimesi

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat Poli Akrilamid Jel Elektroforezi

Wb : *Western Blot*

RNA : Ribonükleik Asit

HSK : Hepatosellüler karsinoma

IRES : *Internal Ribosome Entry Site*

EIA : *Enzyme Immunoassay*

RIBA : Recombinant immunoblot assay

ELISA : *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

TMA : Transkripsiyon aracılı çoğaltma

IFN : Interferon

CD81 : *Cluster of Differentiation 81*

CTL : Sitotoksik lenfosit

HVR-1 : *Hyper variable region 1*

PRK2 : *protein kinase c-related kinase 2*

SRBI : *Scavenger receptor class B type I*, reseptör sınıf B, tip I

LDL : *Low Density Protein*

HDL : *High Density Protein*

IPTG : *isopropyl-β-D-thiogalactoside*

OD : Optik dansite

CLDN1 : Claudin-1

TTTS-T: Tween 20 li Tris tuzlu su

HRP: Horse Radish Peroksidase

mAbs : antibodies molecules

HCV pp : HCV pseudopartikül

HCV cc : HCV cell culture

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans eğitimin boyunca, bilgisiyle ve anlayışıyla her zaman yanımda olan danışman hocam Doç. Dr. İ.M.Ali ÖKTEM'e, engin bilgi deneyimleriyle hiçbir zaman desteğini esirgemeyen saygıdeğer anabilimdalı başkanımız Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU' na, yetişmemde emeği geçen tüm Mikrobiyoloji Anabilimdalı hocalarıma, manevi destekleri ile yanımda olan arkadaşlarıma, bölüm çalışanlarına ve eğitim hayatım boyunca her zaman maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özge ÖZTUNA

ÖZET

HEPATİT C VİRÜS ZARF GLİKOPROTEİNİNİN SAFLAŞTIRILARAK ELDE EDİLMESİ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji AD.

Özge ÖZTUNA

oztunaozge@gmail.com

Hepatit C Virüsü (HCV) enfeksiyonu önemli bir halk sağlığı sorunudur. HCV kronikleşmeye eğilim gösterir ve ilerleyen dönemde siroz ile hepatosellüler karsinoma gibi ağır klinik tablolar gelişebilir. Virüs popülasyonunun türümsü oluşumuna yatkın doğası sayesinde konak bağışık yanıtından kaçabilen varyantların seçilmesi kronik enfeksiyona gidişin göstergelerinden biridir. Zarf glikoproteinlerinin (E1 ve E2) sürekli seçilim baskısı altında olması antikor yanıtından kaçabilen seçilmiş viral varyantların ortaya çıkmasıyla sonuçlanır. E1 proteini, hedef hücrelere virüsün bağlanması ve girişi yanı sıra konak immün yanıtının modülasyonunda da önemli rol oynar. Bu çalışmada, genotip 1b'ye ait bir HCV E1 molekülünün klonlanması ve prokaryotik sistemde ifade ettirilmesini raporladık.

HCV E1 proteininin *E. coli* içinde ifadesi için, 1b genotipindeki bir klinik izolattan tam uzunlukta ve C-terminali kesilmiş E1 dizileri PZT yoluyla amplifiye edilmiştir. Elde edilen ürünler pQE30 vektörüne takılıp klonlandıktan sonra His-etiketlenmiş proteinler olarak *E. coli* içinde ifade edilmiştir. E1 proteinleri *SDS-PAGE* ile karakterize edildikten sonra proteinlerin immün reaktivitesi anti-HCV pozitif serum örnekleri kullanarak *Western Blot* (WB) analizi ile değerlendirilmiştir. Tam uzunlukta ve kesilmiş C-terminal E1 hexa-histidin-etiketli rekombinant füzyon proteinleri olarak prokaryotik sistemde başarıyla ifade edilmiştir. Rekombinant E1 proteinlerinde, HCV ile enfekte hastaların poliklonal serumları kullanılarak immünolojik reaksiyon belirlenmiştir.

Tam uzunlukta viral zarf proteinlerinin prokaryotik ifadesi zor olabilir. Bu çalışmada Türkiye'de ilk kez, immünolojik reaktif olan tam uzunlukta ve kesilmiş E1 proteinlerin başarılı ifadesi raporlanmıştır. Bu çalışmada elde edilen rE1 proteinleri tanısai ve immünolojik ileri çalışmalarda önemli araçlardan olabilir.

Anahtar kelimeler : HCV zarf proteini 1; Rekombinant proteinler; *Escherichia coli*

SUMMARY

OBTAINING OF PURIFIED HEPATITIS C VIRUS ENVELOPE GLYCOPROTEIN

Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences ,Microbiology department,

Özge ÖZTUNA

oztunaozge@gmail.com

Hepatitis C Virus (HCV) infection is a major public health issue. HCV has a propensity to develop chronic infections which may proceed to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. One of the hallmarks of the chronic infection is the quasispecies nature of the viral population which favors the selection of variants that may escape the host immune responses. Envelope glycoproteins (E1 and E2) are constantly under selective pressures resulting in the selection of viral variants that can escape antibody responses. E1 protein also plays important roles in viral attachment and entry into target cells as well as in the modulation of host immune responses. In this study, we report the cloning and prokaryotic expression of a genotype 1b HCV E1 molecule.

For the expression of HCV E1 protein in *E. coli*, full-length and C-terminally truncated E1 sequences from a clinical isolate of subtype 1b virus were amplified by PCR. Resulting fragments were cloned into pQE30 vector and subsequently expressed in *E. coli* as His-tagged proteins. The E1 proteins were characterized by SDS-PAGE. The immunologic reactivity of the proteins were evaluated by western blot (WB) analysis using anti-HCV positive serum samples.

Full-length and C- terminally truncated E1 were successfully expressed in prokaryotic system as hexa-histidine-tagged recombinant fusion proteins. The proteins self-assembled into dimers and trimers as shown by PAGE and WB PAGE analyses. Recombinant E1 proteins were also immunologically reactive using polyclonal sera from HCV infected patients.

Prokaryotic expression of full-length viral membrane proteins can be difficult. We report here the successful expression of the immunologically reactive full-length and

truncated E1 proteins for the first time in Turkey. The rE1 proteins can be important tools for further diagnostic and immunological studies.

Key words : HCV envelope protein 1; Recombinant proteins; *Escherichia coli*

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit C Virus (HCV) *Flaviviridae* ailesinin Hepacivirus genusuna ait, tek zincirli RNA virusudur. Tüm dünyada yaklaşık 180 milyon insanı enfekte ettiği düşünülen HCV bu yönü ile önemli bir halk sağlığı sorunudur. HCV'nin en sık geçiş yolu enfekte kan ile direk temasdır. Kronik HCV'li hastaların %20 kadarında enfeksiyon sonrası 20 yıllık dönem boyunca siroz gelişmektedir. Sirozlularda ise ilerleyen dönemlerde % 0-3/yıl oranında hepatoselüler karsinom (HSK) geliştiği bildirilmektedir (1,2). Bu komplikasyonların ortaya çıkış mekanizmaları henüz aydınlatılamamıştır.

Virüsün hücre kültürlerinde kolaylıkla üretilmemesi, hücreye ve dolayısı ile organizmaya nasıl etkiler yaptığının anlaşılmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle günümüzde HCV nin çeşitli proteinlerinin, farklı vektör ve protein ifade sistemlerine klonlanarak elde edilmesi, bunların hücre metabolizması ve bağışık yanıtı etkilerinin incelenmesi en geçerli deneysel yöntem yaklaşımını oluşturmaktadır.

HCV'ye karşı oluşan konak yanıtları hem enfeksiyonun kontrolünde hemde hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır. HCV ile enfekte hastalarda HCV proteinlerine karşı gelişen ve farklılaşan bağışık yanıtlar hastalığın patogenezinde ve hastaların sağaltım yanıtları hakkında fikir verebilir. Örneğin, çeşitli *Mycobacterium tuberculosis* antijenlerine (CFP-10, Esat-6 gibi) karşı oluşan IFN γ , IL-10 yanıtlarının sağaltımı değerlendirmedeki etkilerine benzer şekilde HCV proteinlerine karşı da immun yanıtların değerlendirilmesi önemli olabilir (3,4).

HCV'nin patogenezinde konak ile ilişkilerinin anlaşılması açısından dış ortamla canlı viral partikülün en çok etkileşim içindeki bölümü olan zarf 1 (E1), zarf 2 (E2) glikoproteinleri dikkat çekmektedir. E1 ve E2 proteinleri virion zarfının esas komponentleridir ve virusun hücreye girişi için gereklidir. Bu glikozillenmiş proteinler poliproteinin E1 için 192-383.aa'ler ve E2 için 384-746.aa'ler arasında uzanırlar ve E1 33-35, E2 70-72 kDa ağırlığındadır (5).

E1 ve E2 tip I transmembran glikoproteinleri olup bu özelliklerini sırasıyla N-terminal 160. ve 334. aa'leri verir. Bu bölgeler membrana tutunma, endoplazmik retikulum (ER) yerleşimi ve virusun bir araya gelme sürecini de içeren çok çeşitli işlevlere sahiptir (6,7).

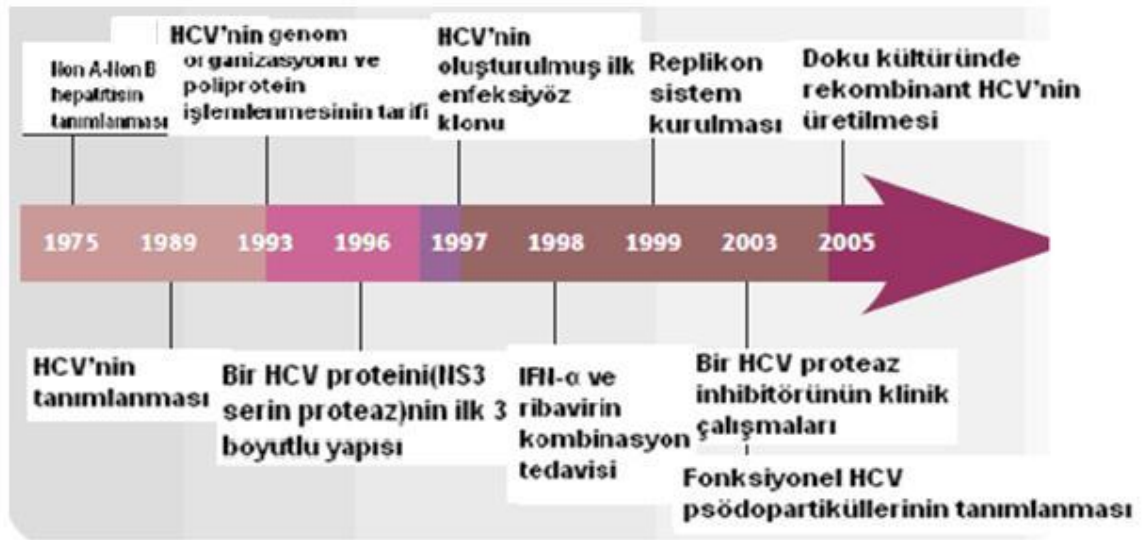
Bu tez ile öncelikle HCV nin E1 proteininin *in vitro* olarak üretilmesi ve saflaştırılması öncelikli hedeftir. Ardından bu rekombinant proteinin özelliklerinin belirlenmesi ve bu kullanılarak bir rekombinant *immunoblot assay* hazırlanması amaçlanmıştır. Bu tür bir testin daha sonra yapılacak kapsamlı çalışmalarda özellikle HCV'ye karşı oluşan sıvısal bağışık yanıt takibinde kullanılabilir olması öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatit C Virüs

2.1.1 Tarihçe, sınıflandırma ve genom yapısı

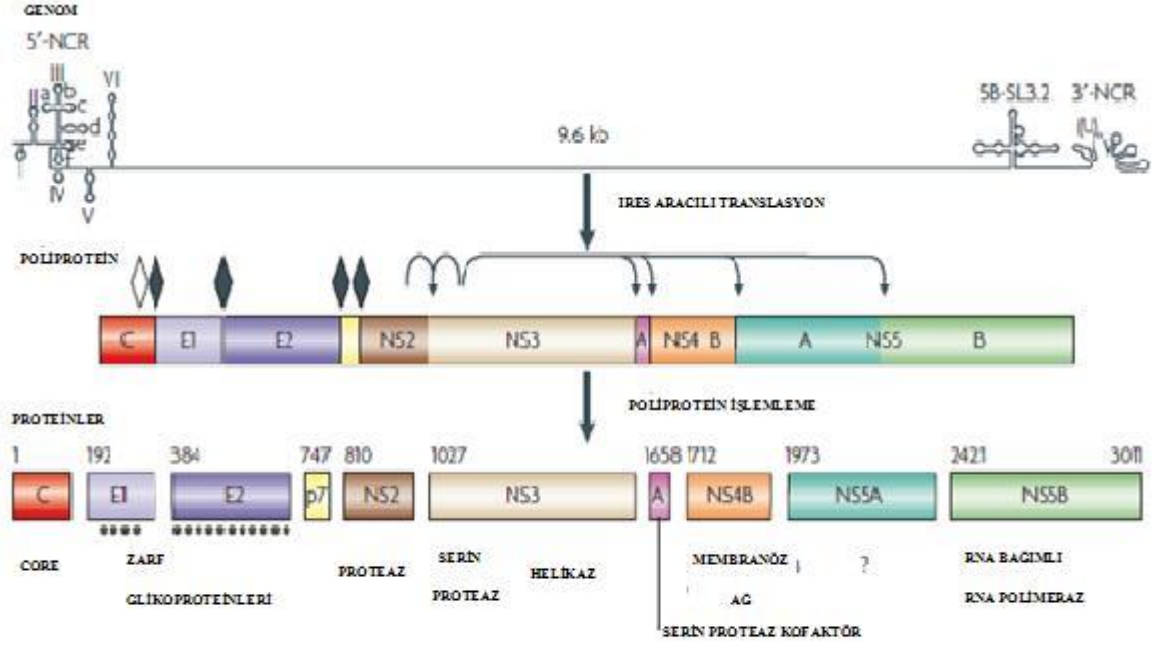
HCV, ilk defa 1989 yılında kan transfüzyonu sonrası hepatit A ve hepatit B olmayan hastaların serumundan cDNA olarak elde edilmiştir (8). 1997 yılında ekspresyon sistemleri kullanılarak cDNA klonları şempezelerde *in vivo* olarak enfeksiyon oluşturmuştur (9). Günümüzde son yapılan çalışmalarda ise, hücre kültürü çalışmaları tamamlanmıştır (10,11). Hepatit C virüs araştırmasındaki kronoloji Şekil 1'de gösterilmiştir (12).



Şekil 1: Hepatit C virüs araştırmasındaki köşe taşları (12)

HCV *Flaviviridae* ailesi, *Hepacivirus* genusu içerisinde sınıflandırılmıştır (13). HCV genom boyutu 9,6 kb olan pozitif zincirli, zarflı bir RNA virusudur (14). 3011 aminoasidiklik tek bir poliproteini kodlar. Genomik yapısı ve proteinlerin dizilim ve büyüklükleri Şekil 2 ile gösterilmiştir (15). Genomun 5' ucu kodlanmayan (*Non-coding*) bölgeyle başlar ve ribozama giriş bölgesi (IRES) içerir, devamında açık okunan bölgeler

(ORF) yapısal ve yapısal olmayan proteinleri kodlar. Genom 3' ucu kodlanmayan bölgeyle biter. Bu poliprotein sentezlendikten sonra çeşitli proteazlar aracılığı ile kesilerek yapısal ve yapısal olmayan en az 10 farklı proteine ayrılır (16).



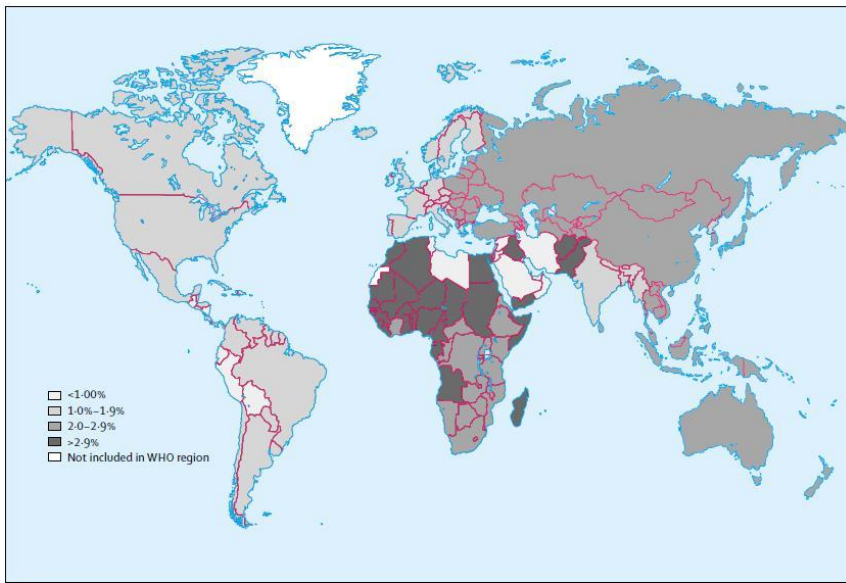
Şekil 2 :HCV genom yapısı ve proteinleri (15)

Yapısal proteinler; core proteini, zarf glikoproteinleri E1 ve E2, iyon kanalı P7 proteinidir. Yapısal olmayan proteinler ise; NS2-3 proteaz, NS3 serin proteaz ve RNA helikaz, NS4A polipeptidi, NS5A proteini ve NS5B RNA bağımlı RNA polimerazdır. (RdRp) (17). Yüksek replikatif aktivite ile birlikte viral RdRp nin düzeltme (*Proof – reading*) mekanizmasının eksikliğinden dolayı virüs yüksek genetik çeşitliliğe sahiptir (18).

HCV izolatları, genotipler ve 21 alttip içerisinde sınıflandırılmıştır. 6 farklı temel genotip vardır ve bunların nükleotid dizilimleri birbirlerinden %30–35 oranında farklıdır. Genotipler 1,2,3...olarak, alttipler a, b, c... şeklinde gösterilirler. Kronik enfeksiyonda meydana gelen genetik değişikliklerin E2 zarf proteinindeki çok değişken bölge 1 (*hypervariable region 1*) üzerine olan etkilerinden dolayı ise türümsülerin ortaya çıkışı indüklenir (19,20,21) .

2.1.2.Epidemiyoloji

Bugüne kadar dünya çapında HCV ile enfekte 170 milyon kişi olduğu tahmin edilmektedir (22). HCV enfeksiyonunun sıklığı dünyada coğrafik dağılıma göre farklılıklar gösterir. Kuzey Afrika, Güney-Doğu Asya, Doğu Akdeniz nüfusunun % 5 i virüsle enfekte iken bu oran Batı Avrupa ve Kuzey Amerika’da yaklaşık %1,7 olarak bildirilmektedir Hastalığın klinik seyri genellikle yavaş ve asemptomatiktir. Çoğu zaman yıllar süren enfeksiyon sonrasında karaciğer hasarı oluşur (23). Ülkemizde Viral Hepatitle Savasım Derneği verilerine göre HCV’nin seroprevalansı %0,3-1,8’dir (24).



Şekil 3 : HCV enfeksiyonun görülme sıklığının dünyadaki dağılımı (25)

HCV ile enfekte bireylerin %70-80' inde kronik enfeksiyon gelişir ve bunların yaklaşık %30' unda karaciğer sirozu meydana gelir. Son dönem karaciğer yetmezliği ve hepatoselüler karsinom ise kronik olarak enfekte hastalarda %0,04 -2,5 oranları arasında gözlenmektedir (26,27,28,29). Günümüzde genel kullanımda kabul görmüş etkili bir HCV aşısı yoktur ve antiviral tedavi hastaların yaklaşık %50 sinde etkilidir (30, 31, 32). Altı HCV genotipi vardır. Bu genotiplerden; genotip 1, 2 ve 3 dünya çapında dağılmıştır ve Batı Avrupa, Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygındır (33,34,35,36). Genotip 4, 5 ve 6 daha farklı coğrafi bölgelerde yaygındır. (37,38,39) Tablo1 de bu dağılım gösterilmiştir

HCV genotip	Yayılım
1,2,3	Tüm dünya
4	Orta Doğu,Afrika
5	Güney Afrika
6	Güneydoğu Asya

Tablo 1 : HCV genotiplerinin dünyadaki dağılımı (40)

2.1.3. HCV Tanısı

HCV enfeksiyonlarının virolojik tanısında kullanılan testler; serolojik testler (antikor testleri, antijen testleri) , nükleik asit tabanlı (NAT) testler ve genotipleme testleridir. Bu testler aşağıda kısa kısa anlatılacaktır.

2.1.3.1.1 Serolojik testler

Bu testlerde tanı, HCV ye ait antijenlerin saptanması ve/veya hastanın serumunda HCV antijenine özgül antikörlerin saptanmasıyla gerçekleştirilir.

-Antikor saptanması

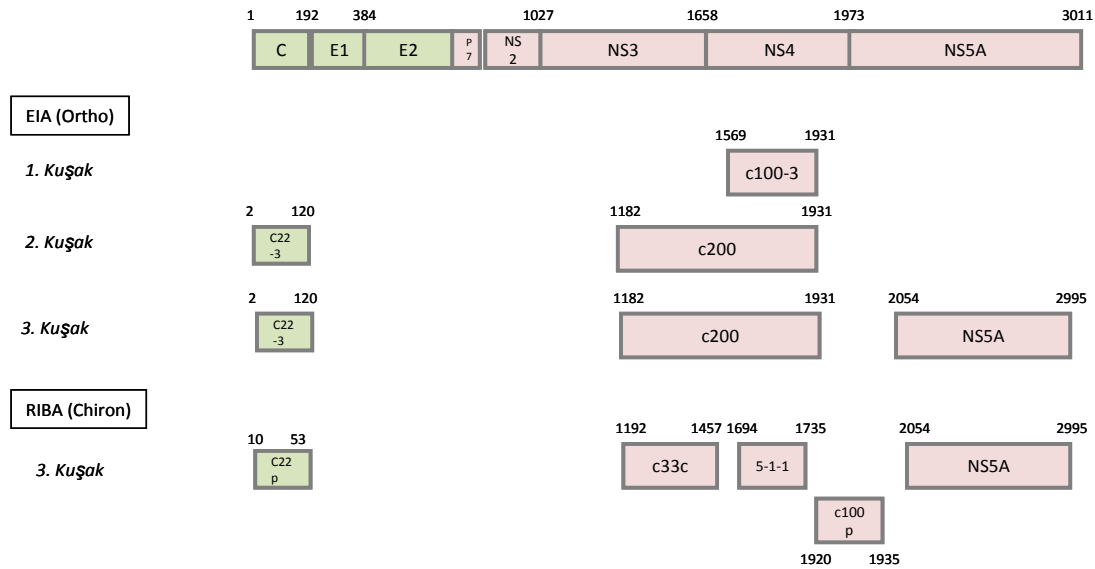
Bu testlerde, HCV ye ait çeşitli rekombinant antijenlerine karşı hastanın serumunda HCV antikörlerin var olduğu saptanabilmekte ve bazı hatalı pozitif sonuçlar azaltılabilmektedir. Yöntem olarak,

EIA (Enzyme Immunoassay): Tarama Amacıyla Anti HCV Antikor Saptanması yöntemidir. Üzerine HCV ye ait çeşitli rekombinant antijenlerin ve/veya peptitlerin yapıştırıldığı stripler kullanılmaktadır. Böylece hastanın serumunda hangi HCV antijenine özgül antikörlerin var olduğu tanımlanabilmekte

RIBA (Recombinant Immunoblot Assay): Doğrulayıcı Anti HCV Testi kullanılmaktadır.

-Antijen saptanması

HCV özyapı antijeninin saptanması ve kantitasyonu için *ELISA* geliştirilmiştir. Doğruluğu ve özgüllüğü iyi , fakat duyarlılığı düşüktür (20 000IU/ml).



Şekil 4: Serolojik testler için kullanılan HCV antijenleri(41)

- Şekilde serolojik testlerde kullanılan HCV poliproteinine ait çeşitli epitoplar görülmektedir. C100-3 peptidinden hazırlanan HCV ELISA, 1. kuşak olarak tanımlanmıştır. Daha sonraları buna elde edilen diğer rekombinant HCV antijenleri (c22-3 ve c200 peptidleri) de eklenerek çeşitli ticari 2. kuşak HCV EIA sistemleri üretime ve kullanıma geçmiştir. Günümüzde kullanılan en yeni ve antikor taramada geçerli kabul edilen 3. kuşak EIA sistemleri ise 2. kuşak sistemlerdeki antijen havuzuna NS5 proteininin de eklenmesi ile hazırlanmıştır. Kullanılan epitoplar arttıkça duyarlılıkta artmıştır.

2.1.3.1.2 . Nükleik asit testleri

HCV tanısında kullanılmak üzere çeşitli viral nükleik asit tarama yöntemleri bulunmaktadır. Bunlar temel olarak kantitatif (viral yükü bildirebilen), kalitatif (pozitif/negatif olarak sonuç veren) ve genotiplemede kullanılan testler olarak üçe ayrılabilir.

- **Kantitatif HCV RNA saptanması;** Bu testler HCV viral yükünün ve tedavi süresinin belirlenmesinde kullanılırlar. Yöntem olarak ;
 - Polimerize zincir tepkimesi (PZT)
 - Transkripsiyon aracılı çoğaltma (TMA)

-Sinyal amplifikasyon teknikleri (bDNA assay) kullanılır. Bu testler arasında analitik duyarlılık ve dinamik saptama aralığı bakımından farklılıklar bulunmaktadır

- **Kalitatif HCV RNA saptanması;** Bu yöntemler özellikle akut enfeksiyonların tanısı, sağaltıma yanıtın incelenmesi ve transfüzyon güvenliğinin sağlanması amacı ile kullanılmaktadır. HCV tanısında kullanılan kalitatif NAT yöntemleri arasında;

-Polimerize zincir tepkimesi (PZT)

-Transkripsiyon aracılı çoğaltma (TMA) sayılabilir

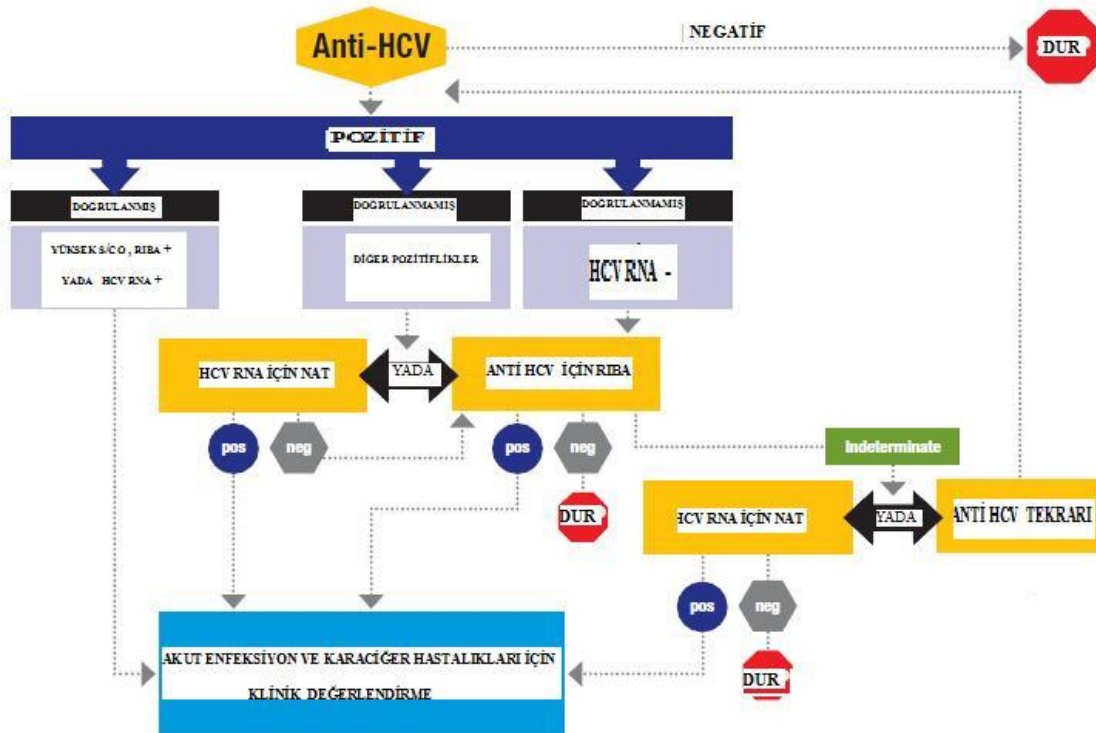
2.1.3.1.3. Genotipleme testleri

HCV'nin 6 genotipi vardır. Bu genotipler arasında interferona yanıt açısından farklar vardır.. Bu nedenle, tedaviye başlamadan önce genotipleme yapılması gereklidir. HCV genotiplerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında;

-Oligonükleotid prob hibridizasyonu

-Doğrudan DNA dizi analizi yer alır.

Genotiplendirme testleri,virüsün 5'UTR, NS5B ve Özyapı bölgelerindeki nükleotid farklılıklarına dayalı testlerdir.



Şekil 5: HCV tanı algoritmi: NAT; Nükleik asid testi, RIBA; Recombinant immunoblot assay (42)

2.1.4 Sağaltım ve Korunma

Son 18 yıldır standart kronik Hepatit C sağaltımı olarak, Pegile İnterferon ile Ribavirin birlikte uygulanmaktadır (43). İnterferon (IFN), HCV replikasyonunu baskılamasına rağmen, mekanizması tam olarak bilinmemektedir (44). HCV sağaltımının seyrini belirleyen en önemli etken virusun genotipidir. HCV genotip 1'in 48 haftalık bir tedaviye yanıt oranı %41-52'dir. Aynı dozlarla 24-48 haftalık bir genotip 2 veya 3 sağaltımında yanıt oranı %76-84'tür. Sağaltım bitiminden sonraki en az 6 ay için HCV RNA yokluğunda kalıcı virolojik yanıt sağlanır (45).

HCV'den korunma yolları; bağışlanan kanların taranması, damar içi uyuşturucu kullanan kişilerin eğitilmesi, aseptik koşullarda ilaç enjeksiyonun önlenmesi, dövme yaptırmada kullanılan araçların hijyenin sağlanması olarak sayılabilir (46).

2.1.5. Viral Proteinlerinin Özellikleri

2.1.5.1. Özyapı (Core) proteini

Tüm genotipler içerisinde en iyi korunmuş protein, Özyapı proteini (47). Core'da denilen protein viral nükleokapsidi oluşturur. Proteinin N-terminal bölgesi bazik, C-terminal bölgesi hidrofobiktir. Protein sitoplazmada bulunup; ER, lipid damlacıkları ve mitokondri ile ilişki içinde bulunur. HCV ile enfekte bireylerde özyapı proteinine karşı oluşturulan antikorlar oldukça yaygın olduğundan bu protein birçok serolojik testte kullanılmaktadır. Özyapı proteini viral replikasyon, olgunlaşma ve patogeneze için önemlidir. HCV partikülünün oluşumuna, hücresel ve viral gen ekspresyonu, hücre transformasyonu ile lipid metabolizması, sinyal yollarının düzenlenmesi gibi süreçlerde etkilidir (48,49,50).

2.1.5.2. E1 ve E2 zarf proteinleri

E1 ve E2 glikoprotein yapısında olup virusun zarfında yer almaktadır. E1 proteini virüsün hücreye bağlanmasında, E2 proteini de virüsün hedef hücreye girişinde görevlidir. E1 192 amino asit uzunluğunda, 33-35 kDa ağırlığındadır. E2 363 aminoasit uzunluğunda, 70-72 kDa ağırlığındadır. Glikozillenmiş bu proteinler, birbirlerine kovalent olmayan bağlı olarak ER membranında bulunmaktadırlar. E2, enfeksiyonun başlangıcında önemli bir role sahiptir. Virüsün hücreye tutunmasının bir veya birkaç hücresel reseptörle E2 etkileşimi aracılığıyla başlatıldığı düşünülmektedir (51,52,53).

E2 çok değişken yapı gösteren bir glikoproteinidir ve bu yüzden E2'nin CD81 gibi ligandları ile etkileşiminin suşu özgü olduğu bildirilmektedir (54). E1 ve E2 proteinleri olgunlaştıktan sonra, kovalent olmayan bir kompleks şeklinde ER içerisinde bulunurlar ve bu proteinler C terminal transmembran bölgelerine doğru birbirleriyle ilişki içerisindeyler.

HCV zarf glikoproteinleri E1 ve E2, N-glikanlar tarafından yüksek şekilde modifiye edilmiştir. Bazı glikanlar virüsün hücreye girişı ve proteinin katlanmasında rol oynar. E1 proteini 6 ve E2 proteini 11 glikozillenmiş bölge içerir. E1 proteini 4 adet korunmuş (H77 referans diziye göre 196, 209, 234 and 305. pozisyonlar) N-glikolizasyon bölgesi içerir. Diğer 2 glikolizasyon bölgesinden 250. pozisyonda olan yalnızca genotip 1b ve 6'da, pozisyon 299 ise yalnızca genotip 2b'de korunmuştur. Glikolizasyon bölgelerinin genotipler arasında korunmuş olması, bunların virüsün yaşam döngüsünde önemli olduklarını düşündürmektedir. Nitekim, bazı glikanların virüsün bir araya gelmesi ve enfektivitesi için gerekli olduğu gösterilmiştir

HCV zarfglikoproteinleri, virüsün hücreye girişini bloke eden antiviral moleküllerin gelişimi için iyi bir hedeftir. Çok değişken bölgeler E2 zarf glikoprotein dizilimi içinde tanımlanmıştır. E2 nin İlk 27 amino asidi HVR1 dir. HVR1 bölgesi eksik bir HCV klonunun, şempazelerde enfeksiyöz olduğu bildirilmiştir (55,56,57). Bu bölge virüsün hücreye girişine yardımcı olur (58). HVR1 bölgesi çok çeşitli olmasına rağmen rezidüellerin pozisyonu ve konformasyonları genotiplerde yüksek oranda korunmuştur. HVR-1 HCV için,nötrale edici bir epitoptur (59). E2 nin diğer çok değişken bölgesi, HVR2 olarak tanımlanmıştır ve bu bölge, E2 nin reseptör bağlamasını düzenler. HVR-2, HVR1 in devamındaki 9 aa'lık dizide yerleşmiştir. Mutasyonların çoğu bu bölgelerde, virüsü nötrale edici antikorlar ve HCV'ye özgöl sitotoksik T lenfositlerin (CTL) baskısı sonucu oluşur (60).

2.1.5.3. P7 proteini

63 aa'lık hidrofobik bir peptittir. P7 polipeptidi HCV poliproteininin yapısal ve yapısal olmayan proteinleri arasında yerleşmiştir. Konak sinyal proteazları tarafından kesilir. Küçük p7 polipeptidi, ER nin lümenine doğru yer alır. Bu proteinin membran geçirgenliğini arttırdığı bilinmektedir. Bu proteinin suni lipid bariyerlerinde bir iyon kanalı oluşturduğunun belirlenmesi bir viroporin olarak işlev görebileceğini desteklemektedir (61,62,63).

2.1.5.4. NS2 Proteini

NS2 bir integral membran proteinidir ve replikasyon için gerekli temel proteinlerden biri değildir (64,65). *In vitro* virus üretiminde ise temel rol oynar. Ağırlığı 21–23 kDa dur. Bu proteinin olgunlaşmış formu bilinmemesine rağmen, poliproteinden kesilmeden önce, NS2/ NS3 bağlantısını kesen proteaz aktivitesine katılır. C-terminal kısmı NS3'ün N-terminali ile birlikte çinko tarafından uyarılan NS2/3 proteaz aktivitesi yapar ve sitoplazmada kalır (66).

2.1.5.5. NS3 proteini

NS3 69 kDa ağırlığında, hidrofobik bir proteindir (67). 5 bölgeden oluşmaktadır. Amino ucundaki 2 bölge (ilk 180 aa) NS4A kofaktörü ile birlikte serin proteazı, karboksi ucundaki 3 bölge ise helikaz'ı oluşturur. 2 farklı enzimatik aktivite içerir. N-terminal ucu, serin proteaz aktivitesinde olup, NS3/ NS4A, NS4A/ NS4B, NS4B/NS5A ve NS5A/NS5B bağlantılarını keser. C-terminal ucu RNA helikaz /NTPaz aktivitesi gösterir. Proteaz ve helikaz aktivitesi HCV replikasyonu için önemlidir. NS3, HCV poliprotein işlenmesinin ve replikasyonunun yanı sıra, proteinin indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) genlerinin aktivasyonuna ve dsDNA kırıklarına sebep olan reaktif oksijen türlerinin üretimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (68,69).

HCV tedavisinde helikaz inhibitörleri gelişmektedir fakat helikazın replikasyon ve virüsün salınımindaki rolü henüz bilinmemektedir.

2.1.5.6. NS4A proteini

NS4A 54 aminoasitlik bir polipeptid olup, NS3 proteaz için kofaktördür. Hidrofobik N-terminal ucu NS3–NS4A kompleksi intrasellüler membranlara zincirlenmiştir. Proteolitik işleme ve RNA replikasyonu burada yapılır (70). Proteinin merkez bölgesi (21–34aminoasitleri) hidrofobiktir ve NS3 ün aktivasyonu için gereklidir(71,72). Asidik C-terminal bölgesi HCV replikasyonunda NS5A fosforilasyonun regülasyonu sağlar (73,74).

2.1.5.7. NS4B proteini

NS4B 27 kDa ağırlığında, integral membran proteini olup, hidrofobik ve amfipatik (yapısında hem hidrofobik hem de hidrofilik gruplar içeren) özellikte α -heliks

içerir. En iyi bilinen işlevi, RNA replikasyonun yapıldığı yer olan membran ağının oluşumunu indüklemesidir (75). NS4B proteinin yapısındaki motiflerin HCV RNA yı bağladığı ve replikasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir (76). C-terminal ucu GTP-bağlayıcı bölge içerir (77). Bir hücrel endozom protein olan Rab5, NS4B ile ilişkilidir ve *in vitro* olarak replikasyonda önemli olduğu ve bu yapının replikasyon kompleksinin (RC) oluşumunda rol oynayabileceği yapılan *in vitro* çalışmada gösterilmiştir (78) .

2.1.5.8. NS5A proteini

NS5A 3 bölge içerir. Bunlar, bölge 1 (1-213.aa'ler), bölge 2 (250-342. aa'ler) ve bölge 3 (356-447. aa'ler) (79). En korunmuş ve kristal yapısı en büyük olan 1.bölgesidir. *in vitro* da RNA ya NS5A proteinini bağlama yeteneğindedir (80). Bölge 2 ve bölge 3 daha küçüktürler ve farklı türler arasında daha fazla dizilim farklılığı gösterirler.

NS5A fosforillenmiş 2 formda bulunurlar bunlar 56 kDa ağırlığında fosforillenmiş bazal formu ve 58 kDa ağırlığında hiperfosforillenmiş formudur. NS5A da meydana gelen mutasyonlar, NS5A hiperfosforilasyon formunu yok eder.

NS5A nın seçici mutasyonları yabancı tip HCV RNA nın replikasyonunu uyarırlar. NS5A, enfeksiyöz partikülün hücreden ayrılması için önemlidir. HCV replikasyonunda NS5A hücrel proteinlerle ilişki içerisinde. NS5A ve insan veziküleriyle bağlı protein A(hVAP-A) arasındaki ilişki, NS5A nın fosforilasyon formu tarafından düzenlenir ve viral replikasyon kompleksinin yapısını içerir (81,82) .

2.1.5.9. NS5B proteini

NS5B 68kDa ağırlığında, genomun negatif ipliğinin tamamlayıcısının sentezlenmesinden sorumlu bir RNA-bağımlı RNA polimeraz (RdRp) dır (83). NS5B, HCV suşlarının genotipler ve alttipler şeklindeki sınıflandırma sistemini oluşturmakta kullanılmıştır.

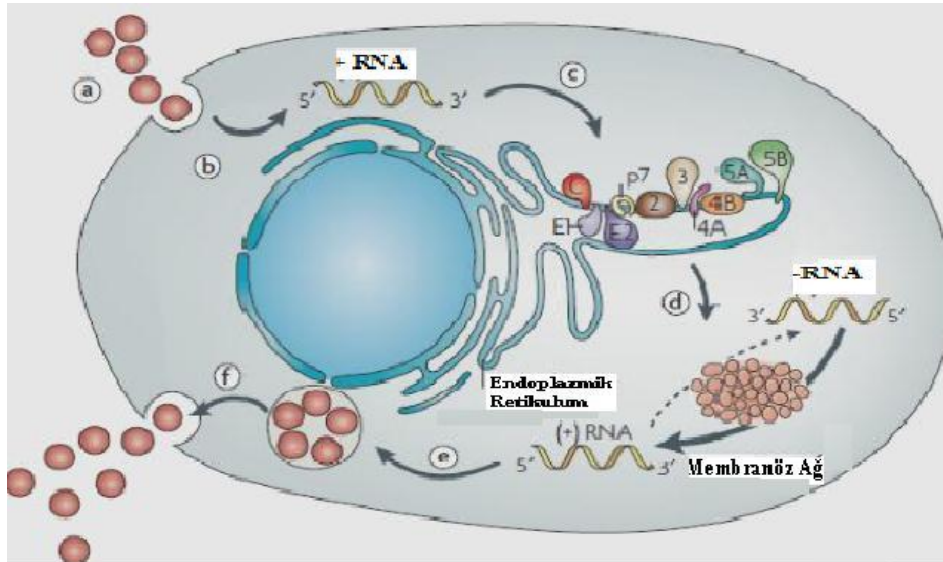
Mn + veya Mg²⁺ kasyonlarının varlığı optimum RdRp etkinliği için esastır. RdRp etkinliği Mn + varlığında, Mg²⁺ iyonlarının varlığından 20 kat daha yüksektir. NS5B nin kristal yapısı sağ el yapısındadır. Başparmak bölgesi bütün RdRp lerde tipiktir. Başparmakta meydana gelen nokta mutasyonu kurtarılabilir fakat proteinin C-terminal bölgesinde meydana gelen mutasyon virüsü öldürücüdür. NS5B, replikasyon sırasında birkaç hücrel proteini bağlar. Proteinin C ucu ile ilişkili protein kinaz 2 (PRK2) parmak bölgeleri bağlar ve fosforilasyonu düzenler (84).

2.2. Hepatit C Virus yaşam döngüsü

HCV enfeksiyonu dinamik bir işlemdir, virüs enfekte bireylerde bir günde 10^{12} viriyon üretir. Hepatosite bağlanarak, klatrin aracılı endositoz ile hücre içine girer. HCV'nin hücresel reseptörleri tanımlanmıştır. Bunlar, glikozaminoglikanlar, LDL reseptörü (LDLR), DC-SIGN, L-SIGN, CD81, SRBI ve Claudin-1dir (85,86,87).

Çevredeki düşük pH endozomal membranla virüsün füzyonunu başlatır ve HCV genomunun sitoplazma içine girişi başlar. Genomun translasyonu IRES te bulunan iyi korunmuş 5' NCR tarafından yürütülür. Translasyon, ribozomun 40S alt ünitesi ile HCV'nin IRES bölgesinin kompleks oluşturmasıyla başlar. Bunu takiben HCV RNA'nın translasyon işlemi sonrasında hücresel proteazlar artar, ve viral proteazlarla birlikte işlev görerek yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin olgunlaşması gerçekleşir (88).

Yapısal proteinler ve p7 polipeptidi endoplazmik retikulum sinyal peptidaz ve yapısal olmayan proteinler NS2-3 proteaz ve NS3-4A serin proteaz tarafından işlenir (89). HCV proteinlerinin ekspresyonu, replikasyon kompleksinin formasyonu sitozol içerisinde gerçekleşir. Replikasyon kompleksi hücre membranı yanında membran ağı şeklinde HCV'nin proteinlerinin ekspresyonu ve genomunun replikasyonunun takiben virüs partiküllerinin paketlenmesi ve salınması gerçekleşir. Tahmin edilen, virionların ER den tomurcuklanması ve dışarıya sekrete olduğudur. Şekil 6 da gösterilmiştir (90).



Şekil 6 : Hepatit C Virüs yaşam döngüsü (90)

- (a) ; virüs bağlanması ve hücreye giriş (b); sitoplazmik salınım ve hücre soyulması
(c); IRES aracılı translasyon ve işleme (d); RNA replikasyonu
(e); paketlenme ve salınım (f); Virionun olgunlaşması ve salınımı

HCV nin yapısal ve yapısal olmayan proteinleri endoplazmik retikulum membranında şematik olarak gösterilmiştir. HCV RNA replikasyonu, membran ağı denilen spesifik membranda meydana gelir. Ağ üzerinde IRES aracılı transkripsiyon ve poliprotein işlemesi gerçekleşir.

2.3. GEN KLONLAMA

Klonlama, istenilen bir genetik bilginin kopyalanarak küçük, orta ya da büyük ölçekte çoğaltılmasıdır (91).

Gen klonlama basamakları şunlardır :

1. Klonlanacak geni içeren DNA'nın 'vektör' olarak adlandırılan sirküler DNA molekülünün içine yerleştirilmesi
2. Vektörün konak hücre içine aktarılması
3. Konak hücrede rekombinant DNA molekülünün çoğaltılması
4. Hücre bölündükçe rekombinant DNA molekülü kopyalarının yeni hücrelere aktarılması
5. Konak hücrelerin büyük miktarlarda üretimi

2.3.1. Klonlama Yöntemleri

1. T/A klonlama
2. Yapışkan uç oluşturarak klonlama
3. Küt uç oluşturarak klonlama

T/A klonlamada restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılmaz. Bu klonlamayla 3'-A uzantısına sahip çift iplikli PZT ürünleri oluşturulur ve DNA polimeraz kullanılarak gerçekleştirilebilir.

Yapışkan uç ve küt uç klonlamalar sırasında ise, özgül DNA dizilerini tanıyan restriksiyon enzimleri kullanılır.

2.3.2. DNA ligasyonu

Vektör ve kopyalanacak DNA'nın uygun şartlarda bir araya getirilerek birleştirilmesi işlemidir. Bu işlem sırasında DNA fragmanlarının birleştirilmesi amacıyla çeşitli DNA ligaz enzimleri kullanılır. DNA ligaz enzimi birleştirilecek fragmanların uçlarında yer alan fosfor gruplarını kovalan olarak bağlayarak işlev görür. Yapışkan uçlu fragmanların ligasyon etkinliği küt uçlu ve T/A fragmanlarına göre daha yüksektir. Ligasyon işlemi sonunda

oluşturulan ve çoğaltılması hedeflenen gen gölgesini taşıyan vektöre “construct” vektöre takılan hedef gen bölgesine de “insert” adı verilir.

2.3.3. Transformasyon

Konak hücelere ligasyon ürünü olan “construct” ların aktarılması işlemine verilen addır. Aktarımın yeterli ve etkili olarak gerçekleştirilmesi için hücrelerin kompetan hale getirilmesi yani “construct” ları rahatlıkla alabilme yeteneğinin kazandırılmış olması gerekir. Bunun için sık kullanılan iki temel yöntem vardır. Bunlar düşük voltajlı elektrik akımı (elektroporasyon) verilerek yapılan fiziksel ve ısıtma ve CaCl_2 yardımı ile yapılan kimyasal yöntemlerdir. Ligasyon ürünü ve kompetan hücreler sıvı ortamda uygun şartlarda ve sürede birlikte inkübe edilerek transformasyon gerçekleştirilir.

2.3.4. Kolonilerin seçimi

Ligasyon ürününün aktarıldığı konak hücrelerinin seçilimi için bu hücreler agar tabanlı antibiyotik içeren uygun besiyeri (LB agar gibi) ve inkübasyon şartlarında tutulur. Çoğu plazmid klonlama vektörü konak hücreye antibiyotik direnci kazandıran en az bir gen taşımaktadır. Transformasyon sonunda hedeflenen geni içine alan hücreler bu antibiyotikleri içeren seçici ortamlar da inkübe edilerek diğer transforme olmamış hücrelerden ayıklanırlar.

2.4. Protein ekspresyonu

Ekspresyon vektörlerinde promotör üzerinde baskılayıcı protein bulunur ve bu protein RNA polimerazın mRNA sentezini başlatmasını engeller. Vektör IPTG, triptofan, gibi maddelerle uyarılabilir. Bu uyarılmanın zamanlaması proteinin elde edilmesini ve miktarını belirler. İndüksiyon sonrası represörün baskısı kalkarak sentez başlatılır Konağın logaritmik faza hangi Optik yoğunlukta ulaştığı, uyarıcının miktarı ve süresi, sıcaklık optimizasyon sürecinde en iyi ürünü alabilmek için ayarlanması gereken faktörlerdir.

2.4.1.Ekspresyon vektörleri

Ekspresyon vektörleri olarak bir çok sistem bulunmaktadır.Aşağıda bu vektörlerin avantajları ve dezavantajları detaylı şekilde açıklanmıştır.

Konakçı	Avantajları	Dezavantajları
Bakteriler (<i>E.coli</i>)	Yüksek verim Basit ve ucuz çoğaltma İyi zaman /mekan verimi İyi bilinen bir organizma,basit kullanılabilme ve yönlendirilebilme Çok sayıda transkripsiyon ve translasyon elemanları bilinmekte	Ökaryotik hücrelerde olan posttranslasyonel modifikasyon ve sekresyon mekanizmalarına sahip değil. Ekspresyon ürünleri inklüzyon cisimleri adı verilen güç çözünür formda.
Böcek hücreleri (<i>Baculavirüs sistemleri</i>)	Yüksek ökaryotik hücrelerin bütün posttranslasyonel protein proses ve sekresyon mekanizmalarımodifikasyonları Yüksek verim mümkün Protein çoğunlukla çözünür formda Baculavirüsler insanlar için enfeksiyöz değil Büyük proteinlerin ekspresyonu içinde uygun sistem	Memeli hücrelerinden farkı, bazı posttranskripsiyonel glikizasyonlar Böcek hücrelerinin çoğalması bakterilerden daha masraflı ve çok zaman alıcı Rekombinant baculavirüslerin çıkış çözeltilerinin kazanılması için daha uzun yöntemler gerekli
Mayalar	Organizma iyi tanınıyor, çoğalma ve işlem ayrıntılı tanımlanmış. Yüksek ökaryoti hücrelerin birçok posttranslasyonel modifikasyonları, protein işleme ve sekresyon mekanizmaları	Memeli hücrelerinden farkı, bazı posttranskripsiyonel glikizasyonlarının olması Bakterilerden daha düşük verim
Memeli hücreleri	Yükse ökaryotik hücrelerin bütün posttranslasyonel protein işleme ve sekresyon mekanizmaları , modifikasyonları	Pahalı ve zaman gerektiren bir çoğaltma Kötü zaman /mekan verimi

Tablo2: Ekspresyon vektörlerinin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları.

2.4.2.Protein ekspresyonunun gösterilmesi

Proteinler doğal veya denatüre edici şartlarda saflaştırılabilir. Bunu proteinin çözünürlüğü, hücre içi yerleşimi, biyolojik aktivitesi gibi şartlar belirler. Inklüzyon cisimleri içinde yoğunlaşan proteinlerin elde edilmesi için denatüre edici şartlar kullanılır.

Protein varlığının doğrulanması için çeşitli yöntemler vardır;

1) Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonrasında coomasie blue ile boyama.

2) *Western blot*: Islak (wet) ve yarı kuru (semi-dry) olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Daha sonra sırasıyla nitroselüloz membrana aktarma, bloklama, proteine özgül enzim işaretli Ab'la karşılaşma ve ışıma veren substrat eklenmesi sonrası fotoğraf filmi ile saptama gerçekleştirilir.

3) Direk koloni kopyalama: Transformasyon sonrası seçici ortamda üreyen kolonilerin üzerine kaplayacak şekilde nitroselüloz membran kapatılır ve daha sonra kaldırılarak IPTG'li seçici besiyerine aktarılır. Ekspresyon araştırması bu membran üzerinden çalışılır.

4) Dot blotting: burada hücre lizatı ve rekombinant protein nitroselüloz membrana damlatılıp daha sonraki membran aşamaları western blot'a benzer şekilde uygulanır (93) .

2.5. HCV Zarf glikoproteinlerinin Biyogenezi

HCV glikoproteinleri N-terminal bölgesi ve C-terminal transmembran bölgesi içerir. Sentezleri sırasında HCV glikoproteinlerinin *ektodomainleri* endoplazmik retikulum lumenine ve transmembran bölgeleri de endoplazmik retikulum membranı içine eklenir. E1 proteinin lümene translokasyonundan, olgunlaşmamış *capsid* proteini sorumludur. Sonrasında HCV zarf proteinleri konak sinyal peptidazı tarafından kesilirler. Deglikozilasyon çalışmaları, HCV zarf proteinlerinin dış bölgelerinin N-bağlı glikanlar tarafından yüksek şekilde modifiye olduğunu gösterir. Bu proteinlerden E1 6 tane E2 11 tane glikozillenmiş bölge içerir. Glikanlar, ER şaperon kaliksinleriyle ilişkili proteinlerin katlanmasında önemli bir role sahiptir. E1 ve E2 proteinleri sentezlendikten sonra kolavent olmayan heterodimerler şeklinde salınırlar. İmmünolokalizasyon çalışmaları ve glikan analizleri HCV zarf glikoproteinlerin ER içinde yerleştiklerini göstermiştir (94).

2.6.Olgun HCV Zarf Glikoproteinlerinin Karakterizasyonu

Her ne kadar zarflı virüsler farklı evrimleşme göstergeleri de hücreye giriş aşamasındaki hücre zarları ile birleşme mekanizmaları birbirleri ile ilişkilidir ve benzerlikler göstermektedir. Hücreye giriş basamakları viral yüzey glikoproteinleri tarafından kontrol edilmekte ve bu glikoproteinler tarafından tetiklenen konformasyon değişiklikleri ile birleşme (füzyon) gerçekleşmektedir. Füzyon proteinlerinin belli segmentleri ki bunlar füzyon peptidleri olarak adlandırılırlar, hedef hücre zarında şekil değişikliklerine yol açarak viral ve hücre zarları birbirine yaklaştırılır. Bu işlevi gerçekleştiren en az iki farklı tipte viral füzyon proteini tanımlanmıştır (94).

Sınıf 1 füzyon proteinleri *orthomyxo-*, *retro-*, *paramyxo-*, and *filoviruslerde* görülür. Bu grup füzyon proteinleri karboksi ucuyla membrana çapalanmış prekürsör proteinin proteolitik olarak amino ucundan kesilmesiyle olgunlaşır. Bu füzyon proteinleri bulaşıcı virionların yüzeyinde, trimerik çıkıntılar halinde bulunurlar ve yarı sabit durumdadırlar. Re-septöre tutunma ya da düşük pH gibi füzyonu tetikleyen olaylar, füzyon peptidinin N terminal ucu ile membrandaki C terminal çapasının “hairpin” formasyonu oluşturacak biçimde yan yana gelmesini sağlar. Bu süreç sonunda hücre ve viral membranların birleşmesi gerçekleşir (94).

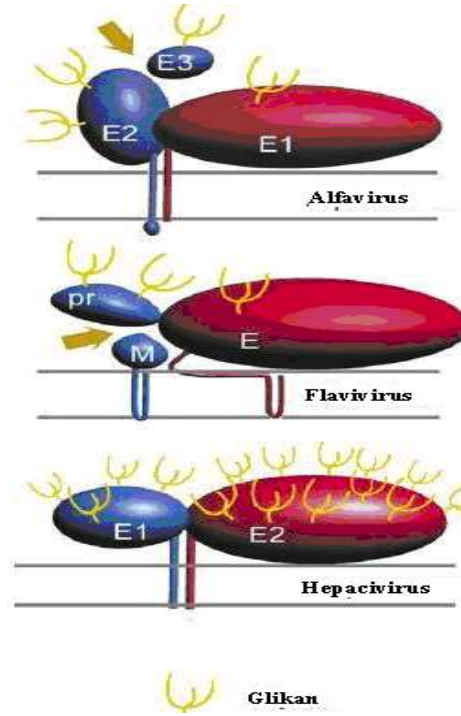
Flavivirüsler ve alfavirüslerde bildirilen sınıf 2 füzyon proteinleri yapısal bazı özellikleri ile sınıf 1 füzyon proteinlerinden ayrılırlar. Bunlar helikal olmayan α -sheet yapısındadırlar. Biyosentezleri sırasında proteolitik kesilme işlemine maruz kalmazlar ve iç kısmı hidrofobik bir halkasal ilmik yapısıyla hedef membran içine girdikleri düşünülür. Sınıf 2 füzyon proteinlerinin ikinci bir zarf glikoproteini ile kompleks olarak sentezlendiği düşünülmektedir (*flavivirüsler* için prM; *alfavirüsler* için pE2). Sentezlenen E ve prM proteinleri birbirleri ile nonkovalan olarak ilişki halindeki heterodimer olarak bulunurlar. Bu proteinler olgunlaşmamış virionlarda ER lümeni içine tomurcuklanarak yapıya katılırlar. Sınıf 2 füzyon proteinlerini taşıyan virüsler sınıf 1’den farklı olarak proteolitik kesim olmaksızın golgi aracılıklı sekresyon yollarıyla taşınırlar ve salınırlar (94).

Alfa ve Flavivirüsler hedef hücrelere reseptör aracılı endositoz ile girerler. Flavivirüslerde bu reseptör tanınması füzyon proteini tarafından gerçekleştirilir. Endozom içinde asidik pH maruziyeti zarf glikoproteinlerinde major bir konformasyon değişikliğine yol açar. Bu değişiklikler sonucunda natif homodimerler ve geri dönüşümsüz olarak homo trimerler oluşur (94).

HCV zarf glikoproteinlerinin sınıf 2 ye ait olduğu düşünülür. Bu sınıfa ait diğer viral zarf proteinleri sekresyon yollarına hücresel bir endoproteaz tarafından taşınır fakat HCV zarf proteinleriyle ilgili böyle bir kanıt yoktur.

Sınıf 2 füzyon proteinlerinin aksine HCV zarf glikoproteinleri yüksek oranda glikozillenmiştir (Şekil 7 de gösterilmiştir).

HCV zarf glikoproteinlerinin *pseudovirus* partikülleriyle yapılan deneysel çalışmalarda düşük pH ya duyarlı oldukları bildirilmiştir. Gerçektende E1E2 hetero dimerlerinin düşük pH ile maruziyetten sonra ayrıştıkları gözlenmiştir. Bu veriler virüsün hücreye pH bağımlı bir endositoz yoluyla girdiğini düşündürmektedir (94).



Şekil 7. Fla Alfa ve Hepacivirusların karşılaştırılması

Sınıf 2 füzyon proteinleri kırmızı renkte gösterilmiştir. *Flaviviruslarda* E proteini ,*alfa virüslerde* E1 *Hepaciviruslarda* E2 proteindir. Mavi renkte gösterilen ikinci membran proteinleridir. Hücreden salınmadan hemen önce, füzogenik aktivite kesim ile sarı renkli glikanlar meydana gelir. Hepacivirüs olan HCV proteinleri sınıf 2 füzyon proteinleri olarak bilinmesine karşın yüksek miktarda glikozillenmiştir.

2.7. HCV hücreye giriş boyunca zarf proteinlerinin rolü

HCV 'nin hücreye bağlanma ve girişinin, karmaşık bir işlem olduğuna inanılmaktadır. HCV'nin girişinde reseptör olarak CD81, SR-BI, claudin ailesi ve occludin gibi çok sayıda bağlanma ve giriş faktörleri kullanılmaktadır. CD81, E2 proteinin suda çözünür formunda yapılan deneyler sonucunda, HCV için erken basamak hücreye giriş reseptörü olarak tanımlanmıştır (95). CD81 25 kDa ağırlığında bir hücre yüzey proteindir ve hücre adezyonu, motilite, metastaz, hücre aktivasyonu ve sinyal transdüksiyonu gibi birden fazla faaliyetler yapar (95). Bu protein, tip III tetraspanin ailesinin üyesi olup, iki ekstrasellüler parça ve kısa bir hücre içi parça içerir. *in vitro* da yapılan çalışmalarda uzun ekstrasellüler parçasının (LEL) E2 bağlanması için gerekli olduğu gösterilmiştir (96). Anti-CD81 antikor ve LEL in çözülebilir rekombinant formları, HuH7 hepatoma hücreleri ve hepatositlerin içinde HCVpp ve HCVcc lerin girişini inhibe ettiği gösterilmiştir (97). CD81 i eksik HepG2 ve HH29 insan hepatoma hücrelerinin transdüksiyonu gösteren daha ileri bir deneyde, CD81 ekspresyonu HCV enfeksiyonunun oluşumuna neden olmuştur (98). Ayrıca, küçük bir RNA (siRNA) ile CD81 'in susturulması sonucunda viral enfeksiyonda bir azalma gösterilmiştir (99). Son ça-

lışmalarda HCVpp ve HCVcc model sistemi kullanılarak anti-CD81 antikoru ile viral girişin inhibisyonunun HCV nin bağlanma sonrası basamağında meydana geldiğine ilişkin kanıtlar sağlanmıştır. Bu bulgular, enfeksiyonun başlatılması sırasında, bağlanma sonrası bir basamakta CD81'in hücresel giriş reseptörü olarak önemli bir rol oynadığını gösterir (100).

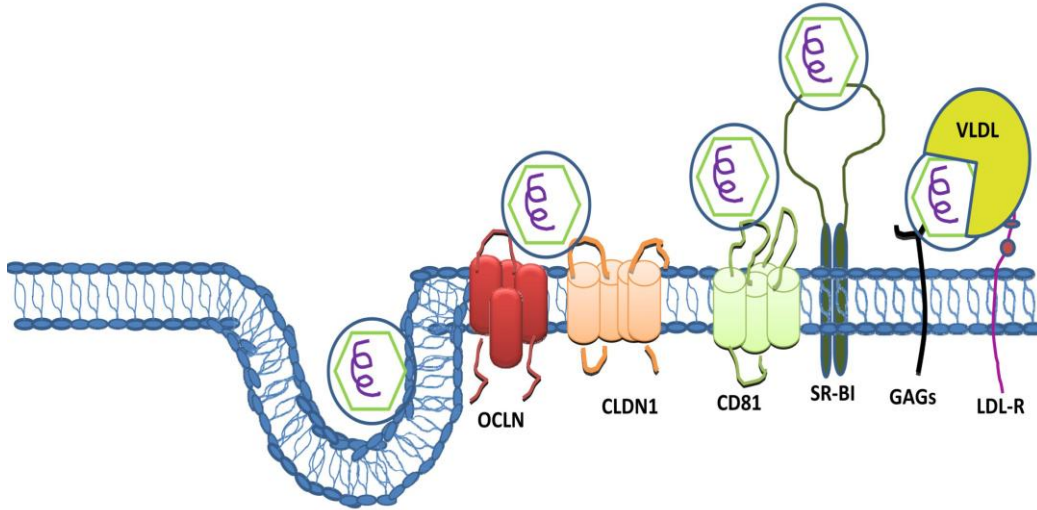
Çözünür E2 (S E2) proteinin CD81-negatif HepG2 hücrelerine SR-BI yoluyla bağlanma gösterdiği ve SR-BI' i reseptör olarak kullandığı gösterilmiştir. SR- BI insan monosit kaynaklı dendritik hücrelerinde olduğu gibi karaciğer ve steroid yapıda (steroidojenik) dokulardada yüksek miktarda eksprese edilir. Hepatositler içine çift yönlü kolesterol taşınması, endozomlar içinde yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) aracılığı ile olur. HDL, HCV'nin hücreye girişini arttırmaktadır. Bu süreç SR-BI'in lipid transfer fonksiyonuna bağlı olarak HDL'nin hücre içine taşınması ile gerçekteşir. Farklı SR-BI ligandlarının enfeksiyon sürecini etkilediği gösterilmiştir. Viral girişte HDL nin hücreye girişi arttırırken, oksitlenmiş LDL nin girişi inhibe ettiği bildirilmiştir (101). SR-BI antikorlarının, HCV benzeri partikülerin hepatosite bağlanmasının yanı sıra HCVpp ve HCVcc lerinin de hücreye girişini inhibe ettiği gösterilmiştir (102).

Başka bir konak hücre molekülü, sıkı bağlantı (tight junction) proteini Claudin-1 (CLDN1)'in yakın zamanda HCV girişi için önemli olduğu bildirilmiştir. Sıkı bağlantılar, yanal hücre zarlarının apikal kutuplarında bulunan sürekli hücreler arası temas bölgeleridir. Çeşitli hücre hatlarında CLDN-1 ekspresyonunun HCVpp ve HCVcc'nin hücreye girişini sağladığı gösterilmiştir. Hepatoma hücrelerinde CLDN-1 ekspresyonunun siRNA ile susturulmasının HCV enfeksiyonunu azalttığı bildirilmiştir. İşaretlenmiş CLDN-1 kullanılarak yapılan antikor bloklayıcı çalışmalarında, bu molekülün HCV girişinin ileri basamaklarında önemli bir yardımcı reseptör olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda, Claudin-6 ve 9 HCV koreseptörleri olarak belirlenmiştir (103). Anti-CLDN-1 antikorları CD81-CLDN1 bağlarını bozarak HCV enfektivitesini nötralize etmiştir. Yapılan son çalışmalar CD81 ile Claudin etki leşiminin HCV enfeksiyonu için gerekli olduğunu doğrulamıştır (104).

Hücre yüzey proteoglikanları üzerindeki glikozaminoglikan zincirleri virüs ve diğer mikroorganizmaların bağlaması için hizmet vermektedir. Glikozaminoglikan ve heparan sülfat, potansiyel bir HCV hücresel reseptörü olarak tespit edilmiştir. HCVcc ve HCVpp nin Heparinle ve yüksek sülfatlanmış heparin ile ön işlemlenmelerinin HuH7 hücreleri üzerine enfektivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (105).

LDL reseptörünün işlevi, dolaşımdaki LDL ve VLDL (çok düşük olduğu yoğunluklu lipidler) yapısındaki kolesterolün ayrıştırılmasıdır. LDL reseptörü, tek geçişli transmembran glikoproteini olup, HCV enfeksiyonu sürecinde rol oynar. LDL veya LDLR'e karşı hepatositlerin monoklonal antikorlarla işlemlenmesinin HCV enfeksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (106).

Güncel veriler HCV'nin hücreye girişi için önemli en az üç hücre molekülü olduğunu göstermektedir. Bunlar CD81, SRBI ve Claudin1 molekülleridir. Bunlar dışında glikozaminoglikanlar, LDL reseptörü veya occludin gibi hücre girişinde rol oynayan moleküllerin işlevleri daha ayrıntılı olarak analiz edilmelidir. Hücre reseptörleri ile E1/E2 heterodimerleri arasındaki etkileşim az bilinmektedir. E2 molekülünde CD81-bağlama bölgeleri tespit edilmiştir (107). Bu bölgelerin hemen yanında, E2'nin N-terminalinde bulunan çok değişken bölgesi 1 (HVRI) vardır. HVRI 27 aminoasitlik bir uzunluktadır ve hücreye bağlanmakta görevli olduğu düşünülmektedir. Bu bölge, güçlü bir konak bağışık basıncı nedeniyle, enfekte bireylerde hızla evrimleşmesiyle bilinmektedir. HVRI bölgesi olmayan HCV klonlarıyla yapılan bir çalışmada şempezelerde zayıf enfeksiyöz göstermesi HVRI bölgesinin enfektivitede önemli bir rol oynadığını düşündürür (108). Başka bir çalışmada da, HVRI'in silinmesi ile HCVpp'nin enfeksiyözitesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir (109). En son veriler HVRI'in, SR-BI reseptörü ile etkileşimle evrildiğini düşündürmektedir (110).



Şekil 8. HCV'nin hücreye girişi

Virionun E1 ve E2 glikoproteinleri hücre yüzey reseptörleri ve proteinleri ile ilişki içindedir. Viral bağlanma ve giriş için gerekli temel reseptörler, CD81, SR-BI, sıkı bağlantı proteini claudin-1 (CLDN1), occludin (OCLN) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleridir (LDLR) (111).

2.8 Virus yaşam döngüsü ve replikasyonunda E1 proteininin potansiyel rolü

HCV karaciğer hücrelerine girerken, E1 zarf glikoproteinine gereksinim duyar ve E1 zarf glikoproteini, HCV'ye karşı nötralizan antikorların oluşumunu tetikler. HCV hastalarında karaciğer hasarı veya enflamasyonuyla ilişkili olan alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (ASP) enzimleri ile E1 antijeni arasında pozitif ve kantitatif bir korelasyon vardır (112). E1 glikoproteininin 270'den 284'e kadar olan aminoasitleri membran füzyonu için gereklidir, bu aminoasitler ya lipid membranla direk etkileşir ya da düşük pH'de E1 kompleksini konformasyonel olarak değişikliğe sürükleyerek füzyon işlemini kolaylaştırır (113). Bu bölge HCV'nin hücreye alımını ve membrana füzyonunu etkileyen "E1 füzyon peptidi benzeri" altbirimini oluşturur (114). E1 reseptörlere füzyon peptid bölgelerinden bağlanır ve hücre içine alınımı için konak hücre membranıyla E1 proteinin füzyonunu indükler. E1'in N-terminal sekansı olan *YEVARNVSGVYH*, E1E2 heterodimerlerinin immunopresipitasyonuna neden olabilir (115). Tanıma ve yapışma sırasında virüs-reseptör etkileşimi için E1 proteininin modifikasyonuna ve/veya katlanmasına ihtiyaç duyulur (116). HCV suşlarının çoğunda, genomun 315. aminoasidinden 327'ye kadar olan aminoasitleri yüksek derecede korunmuştur ve membran porlarının oluşması ve genişlemesini sağlayarak membran destabilizasyonunda rol oynar. E1 glikoproteininin en korunmuş bu bölgesi anti-viral ilaçlar için uygun bir hedeftir. Varsayılan füzyon peptidi (FP) (259-298. aminoasitler) ile E1'in C-terminal bölgesi füzyon sonrası etkileşir, öyle ki bu füzyon sonrası oluşan FP-TM kompleksi virüsün yaşam döngüsünde E1 proteininin önemli bir görevi olduğunu gösterir (117).

2.9. ER zarı ve protein translokasyonu

E1 glikoproteini hücre membranı ile temasta değildir fakat endoplazmik retikulumda birikir. Potansiyel transmembran bölgeleri gibi işlev gören hidrofobik artıkların uzantılarını içerir (118). E1-spesifik immün yanıtları HCV enfeksiyonunun çözülmesinde indüklenebilir ve bellek hücreleri E1 antijeninin optimum altındaki dozlar kullanılarak uyarılabilir (119). N-glikozilasyon bölgeleri, HCV genotipleri arasında güçlü bir şekilde korunmaktadır (120). HCV zarf glikoproteinleri, virüs partikülünün montajı gibi enfeksiyon döngüsünün son basamağına da katılmaktadır. Bu fonksiyonlar, HCV kültür hücre sisteminin gelişimini takiben incelenebilir (121). Bir virüsün hücre içine alımı yaşam döngüsünün önemli bir adımıdır. Bu yüzden zarf proteinleri nötralize edici antikorlar tarafından bloke edilebilir bir hedef veya antiviral ilaçlar için hedef gösterilebilen bölgeleridir. HCV zarf glikoproteinleri, E1 transmembran bölgesinde bulunan bir sinyal yoluyla ER içinde korunur (122). Bir veya daha

fazla hidrofilik artıklar E1 transmembran bölgesi içinde de bulunmaktadır (123). Buna ek olarak E1 ektodomainleri içinde ER içinde kalma sinyalleri içerir (124). Proteinler ER membranı ile ilişkili iken, özyapı ve E1 proteinleri arasındaki etkileşim gerçekleşir (125).

2.10.Tanıda E1 spesifik monoklonal antikorların kullanılması

Akut HCV enfeksiyonu tanısı için, anti-HCV E1 antikorlarının serumdaki miktarı viral yüke göre daha faydalıdır. Çünkü, Bu proteinin tespiti sadece viral RNA nın varlığını değil HCV partiküllerinin montajını ve devamındaki hücre içi reaksiyonları yansıtır (126). HCV ile enfekte olan hastaların plazmasından elde edilen poliklonal antikor ile şempanzelerde klinik öncesi çalışmalar yapılmıştır.Bu çalışmalar sonucunda virüs ile aşılansadan hemen sonra veya aşılama öncesinde, HCV enfeksiyonunun önlenabilir veya geciktirebilir olduğunu göstermiştir (127). Spesifik HCV suşu, karaciğer hastalığının şiddetini ve antiviral tedaviye olan yanıtı belirler. E1 bölgesi, en yaygın HCV genotiplerinin ve alt türlerinin tahmini için kullanılabilir, böylece erken ve doğru tedavi rejimine olanak sağlar. Ayrıca, HCV partikülünün yüzeyine maruz ettiği için nötralize edici antikorlar için gelecek vaat eden bir hedeftir (128). E1 glikoproteinin genomun başlangıcına göre 192. ile 202 .amino asitleri arasında yayılan N-terminal bölgesinde, nötralizasyon epitopları içeren en az iki bölge, epitop haritalaması ile tanımlanmıştır (129). Genomun 315. ile 328. aminoasitleri arası E1 proteinin en korunmuş bölgesidir. 324. pozisyondaki aminoasit ise tamamen korunmuştur (130). E1 monoklonal antikorları etkili bir biçimde HCV pseudopartikülleri genotip 1a, 1b, 4a, 5a ve 6a den nötralize edilmiştir.Ayrıca E1 monoklonal antikorları genotiplerden 2a ve 2b ye karşı az etkin olsa da, genotip 3a yı etkilemez (131).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan çalışma, girişimsel olmayan deneysel nitelikte bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma, 2010-2012 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinden, Hepatit C Virusla enfekte olduğu bilinen bir hastanın serumu alınmıştır. Bu hasta serumu seçilirken HCV RNA'nın pozitifliğinin yüksek titrede olması göz önüne alınmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışma materyali olarak, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarından, kronik HCV hastası olan bir kişinin serumundan izole edilen materyal kullanıldı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Yöntemlerin anlatıldığı kısımda, her yöntemde kullanılan kontrol değişkenleri belirtmiştir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan sarf malzemeleri ve cihazlar

- Çözeltilerin hazırlanmasında 18.2MΩ ddH₂O
- Besiyerlerinin hazırlanmasında dH₂O kullanıldı.
- Otoklavlamalar 121° C 1 Atm basınç, 15 dakika süreyle yapıldı.

0,5M Na₂ EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu

Na₂EDTA (Sigma E5134) 18,6 g

Distile su ile 80 ml'ye tamamlandı.

pH'ı ayarlamak için 100 mM'lık NaOH kullanıldı.

100 ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Tris-Borik asit-EDTA (TBE 5X)

Trizma base (Sigma T1503) 54 g

Borik asit (Sigma B6768) 27,5 g

0,5M Na₂EDTA 20 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı.

50x Tris Asetik EDTA- 1000ml

Tris (Sigma T8524) 0,2 M (242gr)

0,5M Na₂EDTA, pH 8,0 100 ml

Asetik asit (Merck 100056) 57,1ml

Distile su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

Etidyum bromit solüsyonu (10 mg/ml)

Etidyum bromit (Sigma E8751) 1g

Distile su 100 ml

Işıktan korumak için aliminyum folyo ile kaplandı, oda sıcaklığında saklandı

Tris-EDTA (TE 1X) pH=8

Tris-HCL (Sigma T5941) 1,576 g

0,5M Na₂EDTA 2 ml

Bi-distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı.

Magnezyum sülfat çözeltisi (1M)

MgSO₄-H₂O (Applchem A1811,0500) 12,04 g

Distile su 100 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

Magnezyum klorit çözeltisi (1M)

MgCl₂-6H₂O (Applchem A4425,1000) 20,33 g

Distile su 100 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

Potasyum klorit çözeltisi (1M)

KCl (Scharlau PO0200) 3,728g

Distile su 50 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

Glikoz çözeltisi (2M)

D-Glikoz Monohidrat (Merck 108337) 19,80g

Distile su 50 ml

+4 °C’de saklandı.

Agaroz (Sigma A9539) Oda sıcaklığında saklandı.

Ampisilin stok solüsyonu (100 mg / ml)

Ampisilin (Applichem A0839,0010) 1 g

Distile su ile 10 ml’ye tamamlandı

0,22µm’lik filtre ile sterileze edildi

0,5ml’lik alikotlar halinde -20⁰C’da saklandı.

Kanamisin stok solüsyonu (50 mg / ml)

Kanamisin (Applichem A1493,0025) 0,5 g

Distile su ile 10 ml’ye tamamlandı

0,22µm’lik filtre ile sterileze edildi

0,5ml’lik alikotlar halinde -20⁰C’da saklandı.

Ampisilinli (100 µg/ml) ve Kanamisin içeren (25 µg/ml) LB agar hazırlanışı

20g LB agar distile su ile 500ml’ye tamamlandı, otoklavlandı.

100 mg/ml’lik ampisilin stok solüsyonundan 500µL

50 mg/ml’lik kanamisin stok solüsyonundan 250 µL 50-55°C’ye kadar soğutulan LB agar içerisine eklenerek karıştırıldı.

LB Agar ; plaklara dökülerek +4 derecede saklandı.

Ampisilinli (100 µg/ml) ve Kanamisin içeren (25 µg/ml) LB broth hazırlanışı

10 g LB broth

distile su ile 500ml’ye tamamlandı, otoklavlandı.

100 mg/ml’lik ampisilin stok solüsyonundan 500µL

50 mg/ml’lik kanamisin stok solüsyonundan 250 µL LB broth içerisine eklendi.

+4 °C’da saklandı.

LB Broth (Sigma L3022) Oda sıcaklığında saklandı.

Luria-Bertani (LB) agar (Applichem A666,1000) Oda sıcaklığında saklandı.

SOB besiyeri

Tripton(LAB M)	20 g
Maya Özütü (Acumedia)	5 g
NaCl (Applichem A2942,0500)	0.5 g

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı,otoklavlandı

Daha sonra içerisine

0,22µm'lik filtre ile filtre edilen 1M MgCl₂ çözeltisinden 10 ml

0,22µm'lik filtre ile filtre edilen 1M MgSO₄ çözeltisinden 10 ml eklendi ve +4°C'de saklandı.

SOC besiyeri

Filtre edilmiş 2M'lik Glikoz stok çözeltisi	1 ml
SOB besiyeri	99 ml

SOC besiyeri taze hazırlanarak kullanılır.

TFB1-500ml

MgCl ₂ ×6H ₂ O(Ridel-de Haën 13152)	0.1M (10.165g)
MnCl ₂ ×4H ₂ O(Applichem A2087)	0.05M (4.94g)
KOAsetat(Sigma P 1190)	0.03M (1.47g)
CaCl ₂ ×2H ₂ O(Merck 102381)	0.01M (0.74g)
Gliserol (Saf) (J.T.Baker M77809)	%15 (v/v) (75ml)

- Asetik asit ile pH5.8'e ayarlandı
- Gliserol pH ayarlandıktan sonra eklendi
- Distile su ile son hacim 500ml'ye tamamlandı
- 0.45µm'lik filtre ile sterilize edildi. 4°C'da saklandı.

TFB2-500ml

MgCl ₂ ×6H ₂ O(Ridel-de Haën 13152)	0.01M (1.02g)
CaCl ₂ ×2H ₂ O(Merck 102381)	0.1M (7.351g)
MOPS(Sigma M 1254)	0.01M (1.05g)
Gliserol (Saf) (J.T.Baker M77809)	%15 (v/v) (75ml)

KOH ile pH6.8'e ayarlandı
Gliserol pH ayarlandıktan sonra eklendi
Distile su ile son hacim 500ml'ye tamamlandı
0.45µm'lik filtre ile sterilize edildi. 4°C'da saklandı.

IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) stok çözeltisi (100 mM)

IPTG (Fermantas, R0392)	0,238 g
-------------------------	---------

Distile su 10 ml'ye tamamlandı
0.22µm'lik filtre ile steril edildi.
Ependorflara, 1'er ml dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

Isopropanol (Applichem A3928, 0500PE) Oda sıcaklığında saklandı.

Akrilamit, bis-akrilamit tamponu (AB-3)

Akrilamit (Applichem A3812, 0500)	29,0 g
Bis-Akrilamit (Applichem A3636, 0100)	1 g

Distile su ile 100 ml'ye tamamlandı 4 °C'de saklandı.

4xSDS-PAGE Protein Yükleme Tamponu – 10 ml

0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
Glycerol	1 ml
10% SDS	2 ml
Bromophenol Blue	0.25 ml

Distile su ile son hacim 10 ml'ye tamamlandı ve 0.5ml'lik alikotlar halinde oda ısısında saklandı. Kullanmadan önce son konsantrasyon 10 % olacak şekilde Beta-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol eklenir.

10xSDS-PAGE Yürütme Tamponu – 1000ml

Sodyum dodesil sülfat(Sigma L 4390) %1 (w/v) (10g)

Tris(Sigma T 8524) 0.25M (30.3g)

Glisin(Sigma G 7126) 1.92M (144.1g)

Distile su ile son hacim 1000ml'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı

SDS-PAGE jeli isopropanol fiksasyon çözeltisi

İsopropanol 25% (v/v)

Asetik asit 10% (v/v)

H₂O 65%

Oda ısısında saklandı.

SDS-PAGE jeli hızlı Coomassie blue boyama çözeltisi

Asetik asit 10% (v/v)

Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad) 0.006% (w/v)

H₂O 90%

Oda ısısında saklandı.

SDS-PAGE jeli Coomassie blue boyasından arındırma çözeltisi

Asetik asit 10% (v/v)

H₂O 90%

Yarı-Kuru Transfer Tamponu – 500ml

Tris (Sigma T 8524) 0.025M (1.52g)

Glisin(Sigma G 7126) 0.15M (5.63g)

Metanol (Merck 106008) %30 (v/v) (150ml)

Distile su ile son hacim 500ml'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

10xTris Tamponlu Tuzlu Su (TTS) – 500ml

Tris(Sigma T 8524) 0.1M (6.057g)

NaCl(Merck 106400) 1.5M (43.83)g

HCl ile pH7.4'e ayarlandı

distile su ile son hacim 500ml'ye tamamlandı, oda ısısında saklandı.

TTS-Tween 20 (TTST) – 500ml

10x TTS 50ml

Tween20 (Applichem A1389) 2.5ml

Distile su ile son hacim 500ml'ye tamamlandı.

%5'lik Süt tozu ile bloklama tamponu – 50ml

Süt tozu (pınar) 2.5 g

TTST ile son hacim 50ml'ye tamamlandı.

Lisiz Tamponu :

Tampon B (pH=8,0)

Tris (Applichem A2264, 0500) 0,121 g

NaH₂PO₄ (Applichem A2944,1000) 1,56 g

Üre (Applichem A1049,1000) 48,05 g

Non idet P-40 (Applichem A1694,0250) 0,5 ml

İmidazol (Applichem A1378,0050) 0,068g

Distile su 100 ml'ye tamamlandı ve 10M NaOH ile pH8.0'e ayarlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Distile su cihazı: Şimşek Labortechnik SS200

Jel görüntüleme cihazı: VILBER LOURMAT 0519563

Santrifüj cihazı: Heraeus Labofuge 400R

Elektro-blotlama cihazı: Elektro-blotter Sigma Semi-dry blotter Z340502

Dikey jel elektroforez cihazı: Thermo owl 344178 vertical jel electrophoresis system

Yatay jel elektroforez cihazı: Thermo Minicell Submarine Gel System EC320

Etüv: Stuart SI5000

PCR Isı Döngü Cihazı: Techne TC-412

Sonikasyon cihazı: Sonics Vibra-cell VC 100

Vorteks cihazı: IKA NC 28405

Çalkalayıcı: Labnet S 1000-A-220

Spektrofotometre: Thermo Multiscan Spectrum 1500-457

Kullanılan hazır kitler

Taq Polimeraz (5u/μL)	(Fermentas #EP0406)
Pae I (10u/μL)	(Fermentas #ER0051)
HindIII (10u/μL)	(Fermentas #ER0501)
Ribonükleaz inhibitörü (20-50u/μL)	(Fermentas #R1321)
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase	(Fermentas #EP0441)
Goat Anti-Human (IgG) Horse Radish Peroxidase	(Thermo #mc1401377)

3.6.2 Bakteri suşları ve ekspresyon vektörleri:

M15 *E.coli* suşu hem klonlama hem de ekspresyon vektörü olarak kullanıldı.

pQE30 ekspresyon vektörü **JM109 *E. coli* suşu** içerisinde çoğaltıldı.

Suş Genotip

JM109 *E. coli* F' *traD36 lacI_q (lacZ)M15 proA⁺ B⁺/e14 (McrA) (lac-proAB) thi*
gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17 (r_K⁻ m_K⁺) relA1 supE44 recA1 (Promega)

M15 *E. coli* Nal^s Str^s Rif^s *lac ara gal mtl F recA⁺ uvr⁺ lon⁺* (Qiagen)

Vektör

pQE30 (Qiagen)

pREP4 (Qiagen)

3.6.3. Hepatit C Virusuna ait klonlanacak DNA'nın eldesi

Çalışmada kalıp RNA olarak; HCV 1b genotipi taşıdığı bilinen Şükran Angın adlı hastanın serumundan izole edilen total RNA, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan tanısal araştırma amacıyla alınmış ve kalıp RNA olarak kullanılmıştır.

3.6.3.1 cDNA sentezi

- HCV bir RNA virusu olduğu için öncelikle cDNA sentezi yapılır.
- Sentez M-Mulv Enzim kiti prosedürüne göre yapılır.

1. 10 µL kalıp RNA 200 µL'lik tüpe kondu.

2. 1 µL 10 pmol Random Hexamer eklendi

3. Tüp ısı döngü cihazında (Techne TC-412) 65°C'da 5 dakika inkübe edildi ve ardından buzda soğutuldu.

4. M-Mulv 5x buffer	4µL,
10mM dNTP	2µL,
Ribonükleaz inhibitöründen	1µL (20u)
M-MuLV enzim	1µL (200u)

5. Karışım ısı döngü cihazında ;

- 37°C'da 60 dakika,
- 25°C'da 5 dakika inkübe edildi ve reaksiyon durduruldu
- 4°C'da soğutuldu.

6. Sentezlenen cDNA -20°C'da saklandı.

- cDNA lar PZT için kalıp olarak kullanıldı.

3.6.3.2. E1 proteinini için öncül tasarımı :

- "Nested" PZT için iki çift öncül belirlendi.
- Öncüllerin hangi bölgelerin arasını çoğaltacağını belirlemek amacıyla HCV veri bankasına (<http://hcv.lanl.gov>) kayıtlı hcv 1b genotipinin nükleotit dizileri indirildi ve BioEdit 7.0.9 sürümü ile hizalandı.

• Dış ileri öncül olarak yapısal Core proteini içerisinde bulunan ve 1b genotipi içinde korunmuş olan bir bölge ,

• Dış geri öncül olarak yapısal P7 proteini içerisinde bulunan ve 1b genotipi içerisinde korunmuş olan bir bölge seçildi.

İç öncüller olarak; yapısal E1 proteininin 1. ve 584.cü nükleotitleri arasında kalan bölgeyi çoğaltmak üzere öncüller tasarlandı.

İç ileri öncülün beş adet nükleotidi arkasından **SphI (PaeI)** kesim bölgesi eklendi.

İç geri öncülün üç adet nükleotid arkasından **HindIII** kesim bölgesi ve bu kesim bölgesi eklendi.

Primerler;

- **Core dış ileri öncül**

5' -CTC TTT CTC TAT CTT CCT CT-3'

P7 dış geri öncül

5' - TTG AGG ACC ACC AGG WTC T-3'

E1 iç ileri öncül:

5'- CGCGCGCATGCTATGARGTGCGCA-3'

E1 iç geri öncül:

5'- CGCAAGCTTTACCCGTCRACGCC -3'

Altı çizili ve koyu boyalı bölgeler sırasıyla **SphI(Pae1)** ve **HindIII** restriksiyon enzimlerinin tanıma dizilerini içermektedirler.

Koyu boyalı yerler ise öncüllerin dejenere kısımlarıdır.

3.6.3.3. Kesik E1 proteinini için öncül tasarımı :

E1 gen bölgesinin hidrofobik olan son 43 aminoasit dizisi çıkarılarak yeni segmentin geri öncülü tasarlandı.

Kesik E1 iç geri öncül:

5'- CGCAAGCTTAGATCCGGAGCAGCT G -3'

Altı çizili ve koyu boyalı bölge ve **HindIII** restriksiyon enziminin tanıma dizilerini içermektedirler.

3.6.3.4 Protein kodlayan gen bölgesinin iç içe PZT ile çoğaltılması

Klonlanacak proteine ait gen bölgesi, cDNA'dan PZT ile çoğaltılarak elde edildi.

Bu iki aşamada gerçekleştirildi.

- 1) Önce dış ileri ve geri öncüllerle PZT,
- 2) Ardından bu PZT ürünü kalıp olarak kullanılarak iç ileri ve geri öncüllerle hedeflenen proteine ait gen bölgesi çoğaltıldı.

1.PZT: Dış ileri ve geri öncüllerle çoğaltma:

Karışım: 50 µL hacimde hazırlandı.

Distile su	36,5µL
10x Taq Tampon (MgSO ₄ 'sız)	5µL
MgCl ₂ (25mM)	3µL
dNTP (10mM)	2µL
Dış ileri E1 ileri öncül (10pM)	2 µL
Dış geri E1 geri öncül (10 pM)	2 µL

Taq Polimeraz (5u/ μ L)	2 μ L
cDNA	5 μ L

PZT karışımı hazırlanarak,

95 °C’de 5 dakika ilk denatürasyon

94 °C’de 45 saniye

50 °C’de 1 dakika 10 döngü

72 °C’de 2 dakika

94 °C’de 45 saniye

50 °C’de 1 dakika 10 döngü

72 °C’de 2 dakika

94 °C’de 45 saniye

50 °C’de 1 dakika 10 döngü

72 °C’de 2 dakika

94 °C’de 45 saniye

50 °C’de 1 dakika 5 döngü

72 °C’de 2 dakika

72 °C’de 20 dakika son uzatma

+4 °C’de bekleme programıyla çoğaltma gerçekleştirildi.

2.PZT: İç ileri ve geri öncüllerle çoğaltma:

Karışım: 25 μ L’lik hazırlandı. Bu,

Distile su	17 μ L
10x Taq Tampon (MgSO ₄ ’sız)	2,5 μ L
MgCl ₂ (25mM)	1 μ L
dNTP (10mM)	1 μ L
İç ileri E1F öncül (10pM)	1 μ L
İç geri E1F öncül (10pM)	1 μ L
Taq Polimeraz (5u/ μ L)	0,5 μ L
1. PZT ürünü	1 μ L

PZT karışımı hazırlanarak,

95 °C’de 3 dakika ilk denatürasyon

94 °C’de 30 saniye

68°C’de 30 saniye 35 döngü

72 °C’de 1 dakika

72 °C’de 5 dakika son uzatma

+4 °C’de bekleme programıyla 2.çoğaltma gerçekleştirildi.

Kesik E1 çoğaltma

Karışım: 25 µL’lik hazırlandı. Bu,

Distile su	17 µL
10x Taq Tampon (MgSO4’sız)	2,5µL
MgCl2 (25mM)	1µL
dNTP (10mM)	1 µL
İç ileri E1 ileri öncül (10pM)	1 µL
İç geri E1kesik geri öncül (10pM)	1 µL
Taq Polimeraz (5u/µL)	0,5 µL
E1 ürünü	1 µL

PZT karışımı hazırlanarak,

95 °C’de 3 dakika ilk denatürasyon

94 °C’de 30 saniye

68°C’de 30 saniye 35 döngü

72 °C’de 1 dakika

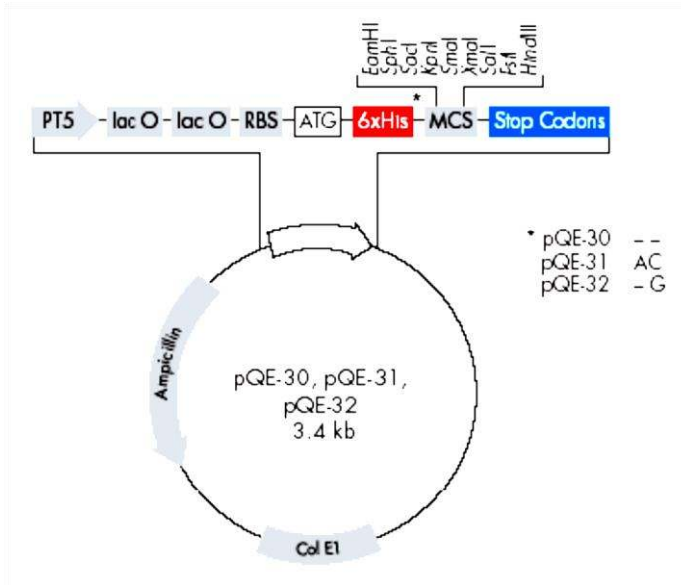
72 °C’de 5 dakika son uzatma

+4 °C’de bekleme programıyla çoğaltma gerçekleştirildi.

3.6.4. pQE30 vektörünün saflaştırılması

-80 °C’de stoklanmış, pQE30 ekspresyon vektörünü içeren JM109 E. coli hücreleri;

- 100 µg / ml Ampisilin içeren 10 ml LB broth içerisinde, 37°C’de bir gece inkübe edildi.
- Nucleospin plazmit ekstraksiyon kiti ile izole edildi.



Şekil 9: pQE30 ekspresyon vektörü

3.6.5. Restriksiyon enzimleri ile kesim

Saflaştırılmış PQE30 ve E1 restriksiyon enzimleri ile kesildi.

E1 PZT ürünü	10 µL
Hind III	0.5 µL
10X Restriksiyon enzim tamponu	2 µL
Distile su	7.5 µL

Karışım 37 °C’de 60 dakika

80°C’de 10 dakika inkübe edildi.

Pae(SphI) 0.5 µL eklendi.

Karışım 37 °C’de 60 dakika

65°C’de 10 dakika inkübe edildi.

Plazmit (PQE30)	1 µL
Hind III	0.5 µL
10X Restriksiyon enzim tamponu	2 µL
Distile su	16.5 µL

Karışım 37 °C’de 60 dakika

80°C’de 10 dakika inkübe edildi.

Pae(SphI) 0.5 µL eklendi.

Karışım 37 °C’de 60 dakika

65°C’de 10 dakika inkübe edildi)

Ürünler %1,5’luk agaroz jelde yürütüldü.

3.6.6. Ligasyon

Ligasyon reaksiyonu hazırlandı. Bütün işlemler buz üzerinde yapıldı.

Vektör(pQE30) 3 µL

PZT ürünü 10 µL

10X ligaz reaksiyon tamponu 2 µL

T4 Ligaz enzimi (5 U / µL) 0.2 µL

Distile su 4.8 µL

Karışım 22 °C’de 1 saat inkübe edildi.

3.6.7. M15 kompetan *Escherichia coli* hücrelerinin hazırlanması

- M15 stoğundan 25 µg/ml kanamisin içeren LB agara 37°C’de bir gecelik inkübasyonla canlandırma yapıldı.

- Daha sonra 10ml 25 µg/ml kanamisin içeren LB broth içine bir koloni ekilerek 37oC’de 200 rpm’de bir gece inkübe edildi.

- 1ml alınarak önceden etüvde 37oC’ye 100 ml kanamisin içeren LB broth içine konarak 37oC’de 200 rpm’de bir saat tutuldu. Bu süre sonunda 30 dakikada bir 600 nm’de OD ölçümü yapıldı.

- OD 0,4-0,5 arasına gelice çalkama durduruldu,buzda 5 dakika bekletildi.

- Buzda soğutulmuş 2 adet falkon tüpüne 50’şer ml dağıtıldı.

- 4°C’de 4000g’de 5 dakika çevrildi. Üst faz dikkatlice atıldı ve dipteki çökeltinin (hücreler) derhal buz üzerine alındı.

- Pelletin (çökeltinin) üzerine yavaşça 15 ml soğuk TFB 1 tampon eklendi. Buz üzerinde 90 dakika bekletildi

- 4°C’de 4000 g’de 5 dakika çevrildi ve üst faz atıldı, hemen buz üzerine alındı.

- Her bir tüpe 2ml buzda bekletilmiş TFB 2 tamponu eklendikten sonra steril mikrosantrifüj tüplerine 200’er µL olacak biçimde alikotlandı ve -80 °C’de saklandı.

3.6.7.1. M15 kompetan *Escherichia coli* hücrelerinin ligasyon ürünü ile transformasyonu

- 20 µL'lik ligasyon ürünleri 100 µL kompetan M15 *E. coli* hücrelerinin üzerine tek hamlede konuldu. Pipetaj yapmadan hafifçe karıştırılarak bir kez masaya vuruldu. Buz üzerinde 30 dakika bekletildi.
- 42 °C'de 90 saniye bekletildi ve çalkalamadan tekrar buz üzerine alındı. 5 dakika bekletildi.
- Daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş SOC besiyerinden 250 µL eklendi ve 200 rpm de 1 saat 37°C'de inkübe edildi.
- Daha sonra 10, 20, 50, 100 µL hacimlerde 25 µg/ml kanamisin ve 100 µg/ ml ampisilin içeren LB agar yüzeylerine, 3'er cm'lik kenarlı üçgen şeklindeki cam öze kullanılarak yayıldı.
- 37°C'de 16 saat inkübe edildi.

3.6.7.2 İnsert içeren kolonilerin seçimi

16 saat sonra belirginleşen transforme koloniler,

- Steril kürdanlar kullanılarak E1 primerlerini içeren master mix tüplerine ve mikrosantrifüj tüplerindeki antibiyotikli LB sıvı besiyerine (900 µL) inoküle edildi
- 37 °C'de bir gece inkübe edildi.

Karışım , hacmi 25 µL olacak şekilde hazırlandı.

Distile su	17 µL
10x Taq Tampon (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1µL
dNTP (10 mM)	1µL
E1 ileri öncül (10 pM)	1µL
E1 geri öncül (10 pM)	1µL
Taq Polimeraz (5 u/µL)	0,5µL
Ürün	1 koloni
95 °C'de 3 dakika	ilk denatürasyon
94 °C'de 30 sn	
68 °C'de 30 sn	35 döngü çoğaltma
72 °C'de 1 dakika	
72 °C'de 5 dakika	son uzatma
+4 °C'de	saklama

1 gece sonra inkübasyonu biten LB sıvı besiyelerinden tekrar pzt reaksiyonu kuruldu.

Karışım, hacmi 25 µL olacak şekilde hazırlandı.

Distile su	17 µL
10x Taq Tampon (MgSO ₄ 'sız)	2.5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	1µL
dNTP (10 mM)	1µL
E1 ileri öncül (10 pM)	1µL
E1 geri öncül (10 pM)	1µL
Taq Polimeraz (5 u/µL)	0,5µL
Ürün	1 koloni
95 °C'de 3 dakika	ilk denatürasyon
94 °C'de 30 sn	
68 °C'de 30 sn	35 döngü çoğaltma
72 °C'de 1 dakika	
72 °C'de 5 dakika	son uzatma
+4 °C'de	saklama

- Bantlar doğrulandıktan sonra; LB sıvıyerleri üzerine 100 er µL % 50 lik gliserol eklendi ve -80 °C ye kaldırıldı.

3.6.8. PZT ürünlerinin dizi analizi

- ❖ PZT sonucu elde edilen vektörün doğru diziyi (insert) taşıdığını anlamak için uygun kolonilerden bir tanesi dizi analizine gönderilmiştir.

3.6.9. Proteinlerin ifadesi ve saflaştırılması

3.6.9.1.E1 proteini için

- 1.Transforme edilen hücreler, -80 °C'de saklanan %5 gliserollü stoktan, 100 µg/ml ampisilin, 25 µg/ml kanamisin içeren LB sıvı besiyeri içerisine alınarak bir gece inkübe edildi.
2. 50 katı hacmindeki 100 µg/ml ampisilin, 25 µg/ml kanamisin içeren yeni LB sıvı besiyerine aktarıldı.
3. 37 °C de 200 rpm de OD₆₀₀=1 oluncaya dek inkübe edildi.
4. 1 mM IPTG eklendi ve 37 °C'de 200 rpm de 7 saat daha inkübe edildi.
5. +4 °C'de, 4000 g'de 7 dakika santrifüj yapıldı, elde edilen hücre çökeltileri -70 °C'de saklandı.

6. 10 ml hacimdeki kültürden elde edilen çökelti üzerine 10ml lizis tampona 1 tablet olacak şekilde proteaz inhibitör kokteyli eklenmiş 1000 µL hacimde % 0,5 NP-40 içeren tampon B eklenerek köpürtmeden vortekslendi ve homojenizasyonu sağlandı.
7. Buz üzerinde 5-10 dakika erimesi beklendi.
8. Karışım buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
9. +4 °C’de , % 70 amplitütte, 1 saniye sonikasyon 1 saniye bekleme dönemleri ile 1 dakika süren sonikasyon işlemi 3 kez tekrarlandı.
10. Oda sıcaklığında 1 saat süre ile köpürtmeden vortekslenerek, inklüzyon cisimciklerinin açılması sağlandı.
11. 10.000 g’de, 25 dakika çevrildi.
12. Hücre lizatının süpernatant kısmı alınarak, buz üzerinde soğutulmuş yeni bir ependorfa aktarıldı.

3.6.9.2. Kesik E1 protein için

1. Transforme edilen hücreler, -80 °C’de saklanan %5 gliserollü stoktan, 100 µg/ml ampicilin, 25 µg/ml kanamisin içeren LB sıvı besiyeri içerisine alınarak bir gece inkübe edildi.
2. 50 katı hacmindeki 100 µg/ml ampicilin, 25 µg/ml kanamisin içeren yeni LB sıvı besiyerine aktarıldı.
3. 37 °C de 200 rpm de OD₆₀₀=1 oluncaya dek inkübe edildi.
4. 1 mM IPTG eklendi ve 37 °C’de 200 rpm de 4 saat daha inkübe edildi.
5. +4 °C’de, 4000 g’de 7 dakika santrifüj yapıldı, elde edilen hücre çökeltileri -70 °C’de saklandı.
6. 10 ml hacimdeki kültürden elde edilen çökelti üzerine 10ml lizis tampona 1 tablet olacak şekilde proteaz inhibitör kokteyli eklenmiş 1000 µL hacimde % 0,5 NP-40 içeren tampon B eklenerek köpürtmeden vortekslendi ve homojenizasyonu sağlandı.
7. Buz üzerinde 5-10 dakika erimesi beklendi.
8. Karışım buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
9. +4 °C’de , % 70 amplitütte, 1 saniye sonikasyon 1 saniye bekleme dönemleri ile 1 dakika süren sonikasyon işlemi 3 kez tekrarlandı.
10. Oda sıcaklığında 1 saat süre ile köpürtmeden vortekslenerek, inklüzyon cisimciklerinin açılması sağlandı.
11. 10.000 g’de, 25 dakika çevrildi.
12. Hücre lizatının süpernatant kısmı alınarak, buz üzerinde soğutulmuş yeni bir ependorfa aktarıldı.

3.6.9.3. SDS-PAGE için örneklerin ve jellerin hazırlanması

%15 lik SDS poliakrilamit jelin hazırlanması

Distile su	2.3ml
% 30 Akrlamit Bis-Akrlamit	5 ml
1.5M Tris (pH: 8.8)	2.5ml
%10 SDS	100µL
%10 Amonyum persülfat	100µL
TEMED	4 µL

- Homojenize etmek için çalkalandı ve hemen bir enjektör yardımı ile döküldü.
- Üzerine isopropanol eklendi. Kuruması için 45 dakika beklendi.

Bu jel E1 için dökülmüştür.

Kesik E1 proteini için %12 lik jel dökülmüştür.

%12 lik SDS poliakrilamit jelin hazırlanması

Distile su	3.3ml
% 30 Akrlamit Bis-Akrlamit	4 ml
1.5M Tris (pH: 8.8)	2.5ml
%10 SDS	100µL
%10 Amonyum persülfat	100µL
TEMED	4 µL

- Homojenize etmek için çalkalandı ve hemen bir enjektör yardımı ile döküldü.
- Üzerine isopropanol eklendi. Kuruması için 45 dakika beklendi.

Paketleme jellerinin hazırlanışı

Distile su	1.4 ml
% 30 Akrlamit Bis-Akrlamit	0.330ml
1M Tris (pH:6.8)	0.250 ml
%10 SDS	20µL
%10 Amonyum persülfat	20µL
TEMED	2µL

- 1 saat paketlenme jelinin polimerize olması için beklendi ve taraklar dikkatlice çıkartıldı.
- 1X SDS PAGE yürütme tamponu (running buffer) ile doldurulmuş tanka yerleştirildi.
- 0.saat hücre lizatı, 7.saat hücre lizatının üzerine kendilerinin 1/5'i kadar 5X SDS-PAGE örnek tamponu eklendi.
- Örnekler önceden 100 °C'ye ayarlanmış ısı bloğunda 7 dakika kaynatıldı ve 1.000 g'de 5 saniye çevrildi.

3.6.9.3. 1 SDS-PAGE

- 1.Marker ve örneklerden 20'şer µL yüklendi.
- 2.Marker ayırma jeline gelene kadar 70 voltta, buradan sonra 110 voltta yürütülerek marker bantları yeterince açılınca elektroforez işlemi durduruldu.
- 3.Jel nazıkce çıkarılarak isopropanol fiksasyon çözeltisi içinde 45 dakika 100rpm'de çalkalandı.
- 4.İsopropanol fiksasyon çözeltisi yavaşça boşaltılarak SDS-PAGE jeli hızlı Coomassie blue boyama çözeltisi eklendi ve 2 saat 100 rpm'de çalkalandı.
- 5.Ardından SDS-PAGE jeli hızlı Coomassie blue boyama çözeltisi boşaltılarak Coomassie blue boyasından arındırma çözeltisinde over night 100rpm'de çalkalandı ve görüntülendi.

3.6.9.3.1.2 Western Blot

- 1.Marker ve örneklerden 20'şer µL yüklendi.
- 2.Marker ayırma jeline gelene kadar 70 voltta, buradan sonra 110 voltta yürütülerek marker bantları yeterince açılınca elektroforez işlemi durduruldu.
- 3.Jel ile aynı boyutta iki adet watman kâğıdı yarı kuru transfer tamponu ile ıslatılarak elektroblotter üzerine yerleştirildi.
- 4.Jel ile aynı boyutta kesilmiş Nitrosellüloz membran, distile suda 2 dakika bekletildikten sonra yarı kuru transfer tamponu ile ıslatıldı ve transfer tamponu ile ıslatılmış watman kâğıtlarının üzerine yerleştirildi.
- 5.Jel, Nitrosellüloz membranın üzerine yerleştirildi.
- 6.Jel ile aynı boyutta iki adet Watman kâğıdı yine yarı kuru transfer tamponu ile ıslatılarak jelin üzerine yerleştirildi.
- 7.Daha sonra bir cam tüp bu tabakaların üzerinde yuvarlanarak, tabaka aralarındaki hava kabarcıkları giderildi.

- 8.Elektro-blotter cihazının anot kutbuna bağı kapağı kapatıldı.
- 9.10 voltta 2 saat boyunca elektrotransfer işlemi gerçekleştirildi.
- 10.Karıştırıcı üzerinde, TTTS-T içerisinde çözünmüş 30 ml % 5 lik süt tozu (w/v) bloklama solüsyonu içerisinde oda ısısında bir saat inkübe edildi.
- 11.Bloklama solüsyonu ile 1/1000 oranında seyreltilen birincil antikoru (hasta serumu) içeren kaba alınan Nitrosellüloz membran +4 C bir gece çalkalanarak inkübe edildi.
- 12.Nitrosellüloz membran TTST-T ile çalkalayıcıda 10 dakika boyunca 2 kez yıkandı.
- 13.Membranın yıkandığı TTTS-T tamponu döküldü ve bloklama solüsyonu ile 1/5000 oranında seyreltilen ikincil antikor [yaban turpu peroksidaz (horse-radish peroxidase) isaretili anti-Human IgG] içeren kaba alınan Nitrosellüloz membran oda sıcaklığında 2 saat 100 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi.
- 14.Nitrosellüloz membran TTST-T ile çalkalayıcıda 10 dakika boyunca 6 kez yıkandı.
- 15.Temiz bir cam yüzeyine alınan Nitrosellüloz membran üzerine yaban turpu peroksidaz ile tepkimeye giren 4 kloro 1 alfa naftol substratı membranın üzerini kaplayacak şekilde döküldü.
- 16.Onbeş dakika sonra protein bantları mor renk vermeye başladı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

		2010	2011	2012
--	--	------	------	------

NO	işin Tanımı	OCAK	ŞUBAT	MART	NİSAN	MAYIS	HAZİRAN	TEMMUZ	AĞUSTOS	EYLÜL	EKİM	KASIM	ARALIK	OCAK	ŞUBAT	MART	NİSAN	MAYIS	HAZİRAN	TEMMUZ	AĞUSTOS	EYLÜL	EKİM	KASIM	ARALIK	OCAK	ŞUBAT	MART	NİSAN
1	Literatür Taranması	x	x																										
2	Primer Tasarlanması			x	x																								
3	PZT optimizasyonu					x	X	x																					
4	klonlama								x	x																			
5	ligasyon ve transformasyon										x																		
6	protein ekspresyonu											x	x																
7	sds page													X															
8	western blot optimizasyonu														x	x													
9	Kesik e1 primer tasarımı																x												
10	Kesik e1 pzt																x												
11	Kesik e1 klonlama																	X											
12	Kesik e1 ligasyon ve transformasyon																		x										
13	protein ekspresyonu																			x	x								
14	sds page																					x							
15	western blot optimizasyonu																						x	x	x				
16	Tezin yazılması																									x	X	x	x

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Çalışma sonucunda elde edilen veriler bulgular kısmında açıklanmıştır.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışma ile ilgili sınırlamalara tartışma kısmında değinilmiştir.

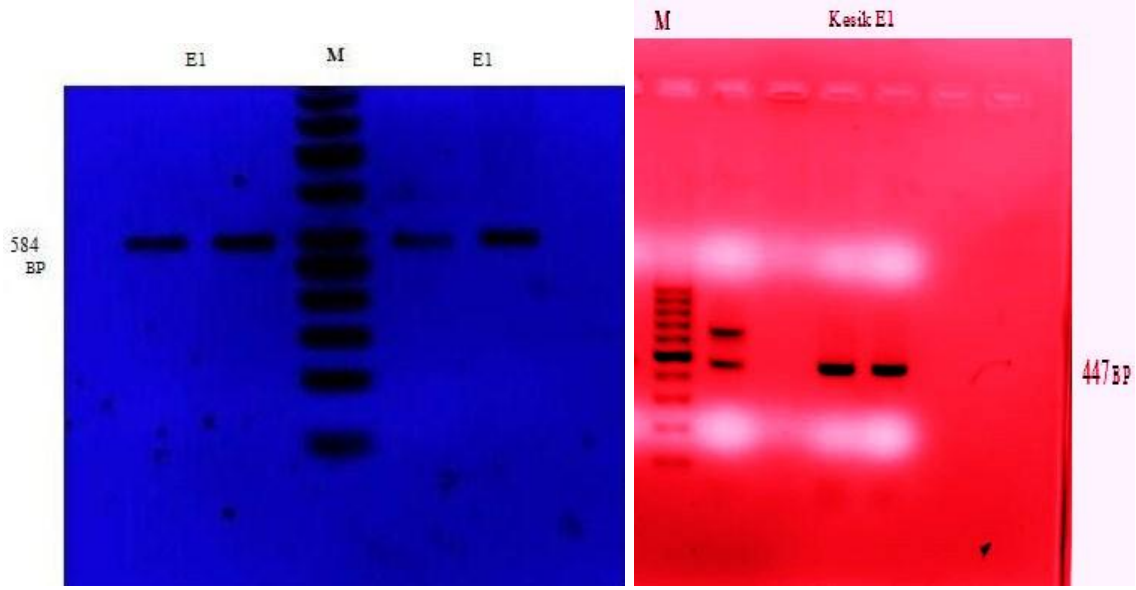
3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Değerlendirme Komisyonu'nun 29.05.2005 tarihli 252 nolu protokol kararı ekte verilmiştir

4.BULGULAR

4.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi

Kalıp RNA olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan tanısal araştırma amacıyla elde edilmiş HCV genotipi 1 taşıdığı bilinen hasta örneğinden izole edilen total RNA'dan cDNA elde edilmiş, ardından 'Nested' PZT yapılmıştır. Ürünlerin %1.5 agaroz içeren jeldeki görüntüleri Şekil 11 ve Şekil 12 de görülmektedir.



Şekil 10: HCV'ye ait E1 PZT ürünü

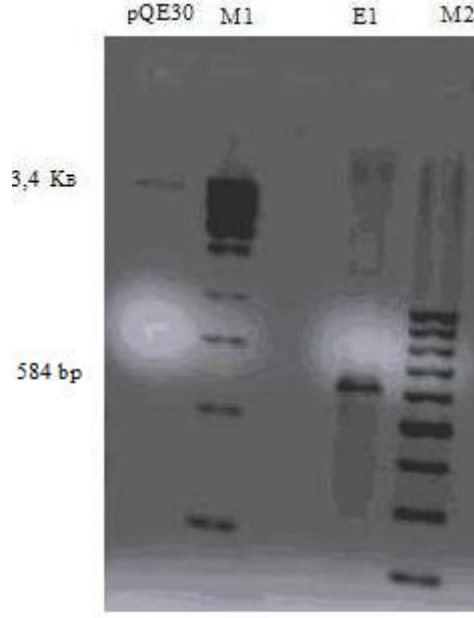
Şekil 11: HCV'ye ait kesilmiş E1 PZT ürünü

M: Fermantas #SM0241

120 Volt'da 45 dakika yürütülerek görüntülenmiştir. M: "Marker"

4.2. Restriksiyon Enzim Kesimi ve Ligasyona Girecek Ürün Seçimi

Ligasyon tepkimesine girecek ürünlerin büyüklüklerinin doğru ve konsantrasyonlarının birbirine yakın olması en uygun şekle sokma (optimizasyon) çalışmaları için önemlidir. Çalışmamızda kesim sonrası ligasyonda kullanılacak vektör ve insert miktarları agaroz jel elektroforezi sonrasında görsel olarak değerlendirilmiş ve seçim buna göre yapılmıştır. Ürünlerin %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri aşağıdadır.



Şekil 12 : pQE30 ve E1 in agaroz jel görüntüsü

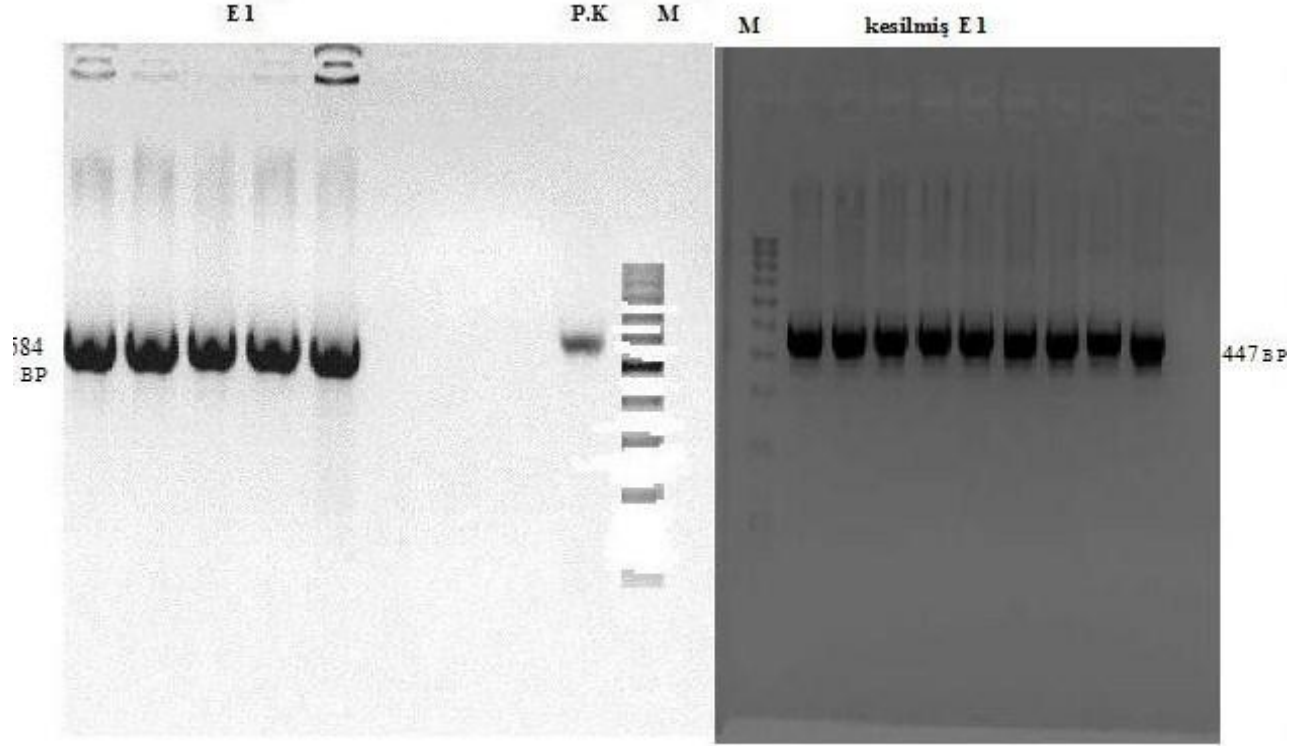
M1: Fermantas # SM0313

M2: Fermantas #SM0241

Bu örnekler belirli oranlarda kullanılarak ligasyon reaksiyonuna alınmışlardır.

4.3. Transformasyon ürünleri

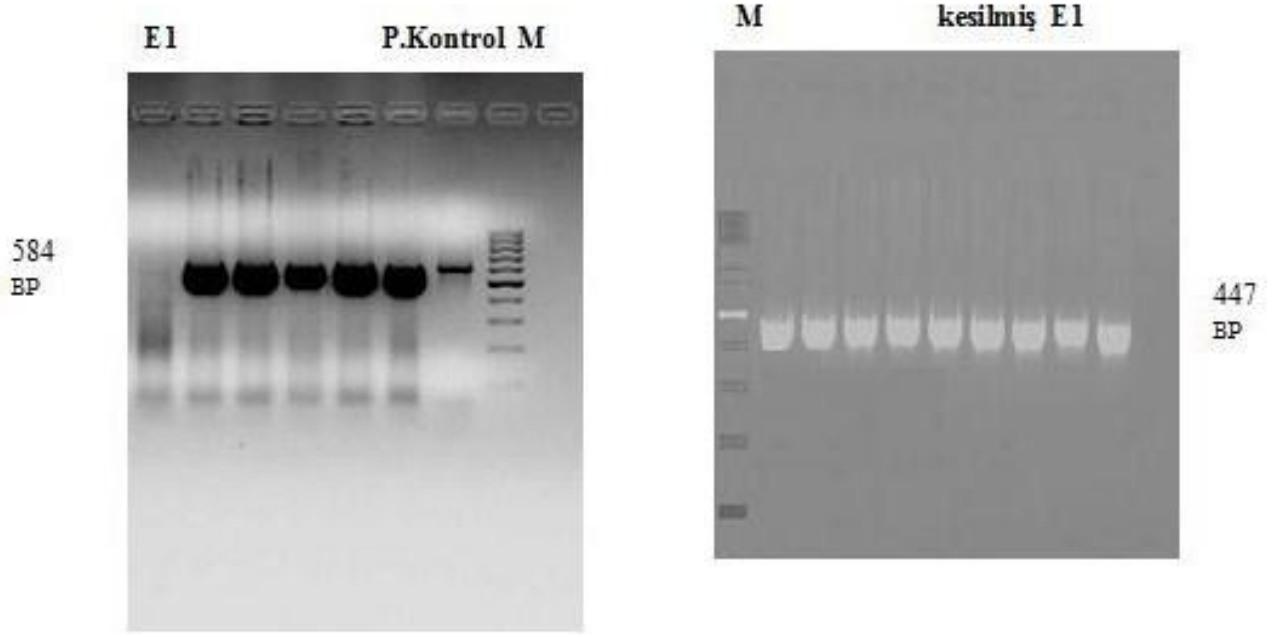
İç öncüller kullanılarak çoğaltılan ürün pQE30 vektörüne takıldı ve *E. Coli* M15 hücrelerine transformasyon sonrasında rekombinant vektörü içeren kolonileri saptamak için koloniler havuz PZT ile tarandı



Şekil 13: Transformasyon sondası üreyen kolonilerden yapılan PZT'lere ait agaroz jel görüntüsü

M: Fermantas #SM0241

Daha sonra görsel olarak uygun yoğunlukta bantlar içerdiği düşünülen tüpleri oluşturan kolonilerin ayrı ayrı PZT'si yapılarak E1 içeren plazmid bulunduran kolonilerin seçilmesi sağlandı.



Şekil 14: Transformasyon sonrası üreyen kolonilerden doğrulama amaçlı yapılan PZT'lere ait ürünlerin agaroz jel görüntüsü

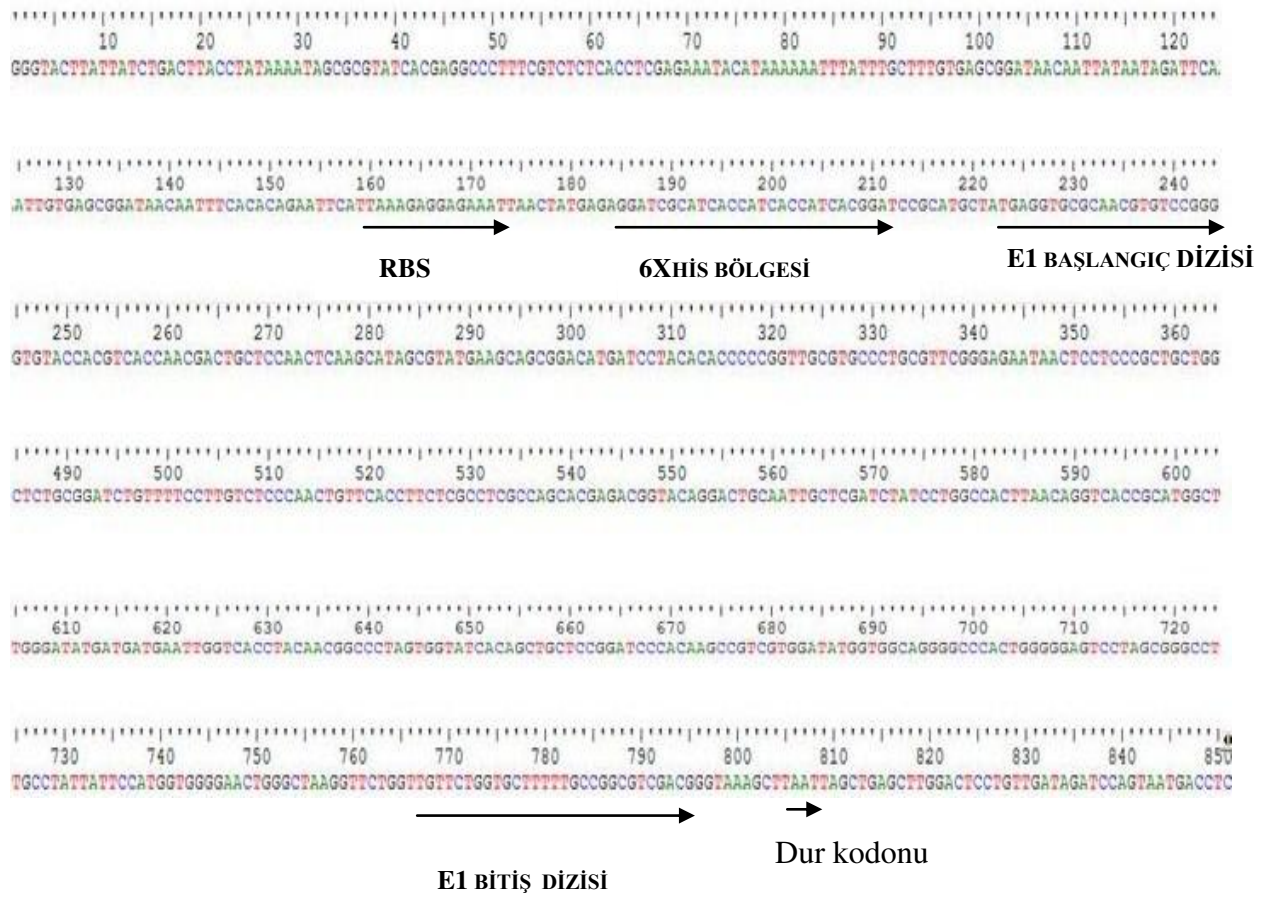
M: Fermantas #SM0241

Olası insert'li pQE30 bulunduran koloni, dizi analizi, ekspresyon ve saflaştırma için seçildi.

4.4. pQE30-E1 DNA Dizilimi

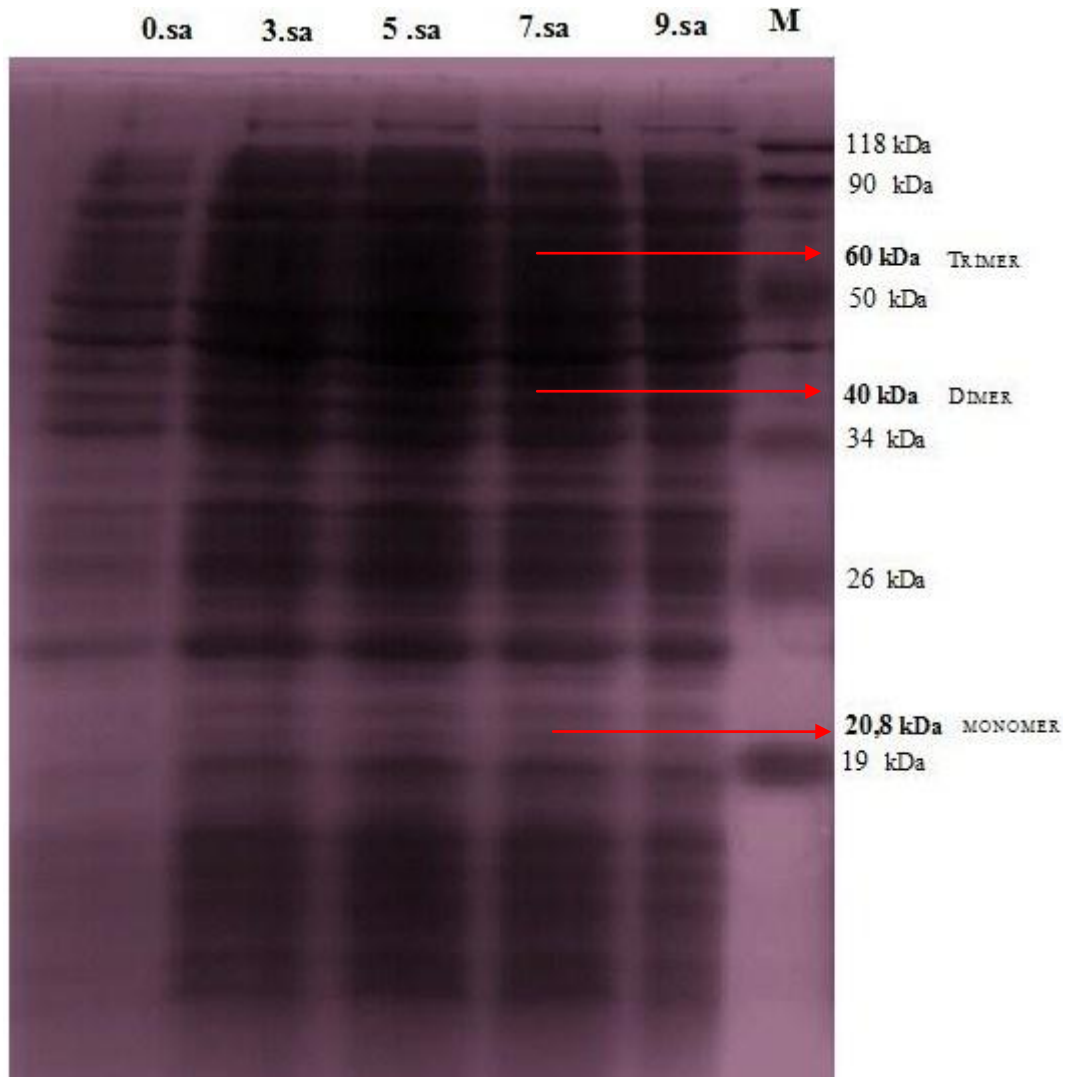
Protein üretimine geçmeden önce klonlanan dizinin, vektörün çerçevesine doğru oturduğunun doğrulanması gerekmektedir.

- Bu nedenle yapılan rekombinant ürünün DNA dizi analizi şekilde gösterilmiştir. İnser'tin doğru yönde ve çerçeve kayması olmadan yerleştiği aminoasit dizileri ile de doğrulanmıştır (Şekil 15).

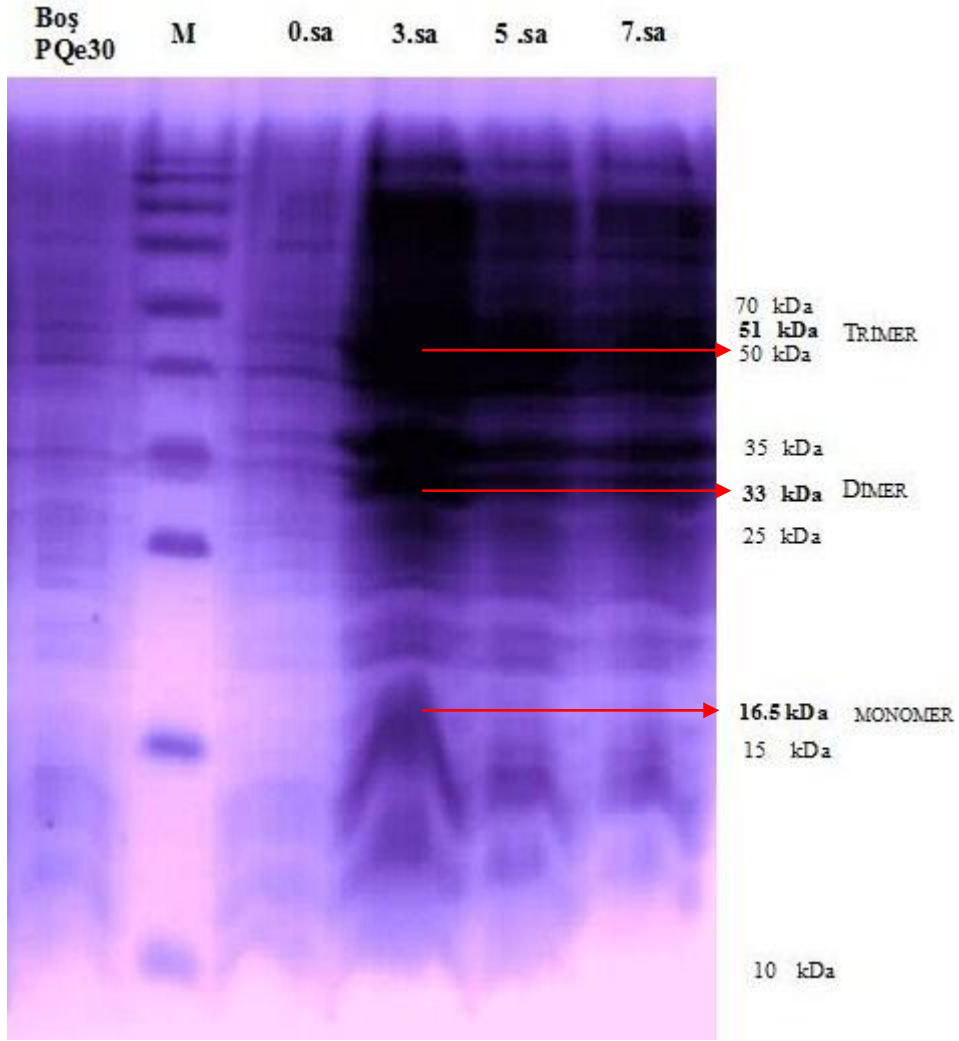


Şekil 15: E1 içeren pQE30 vektörüne ait DNA dizi analizi ve karşılık gelen aminoasit dizileri (RBS: Ribozomal bağlanma sahası)

4.5 Rekombinant E1 Preparatının SDS PAGE ve Western Blot Analizi

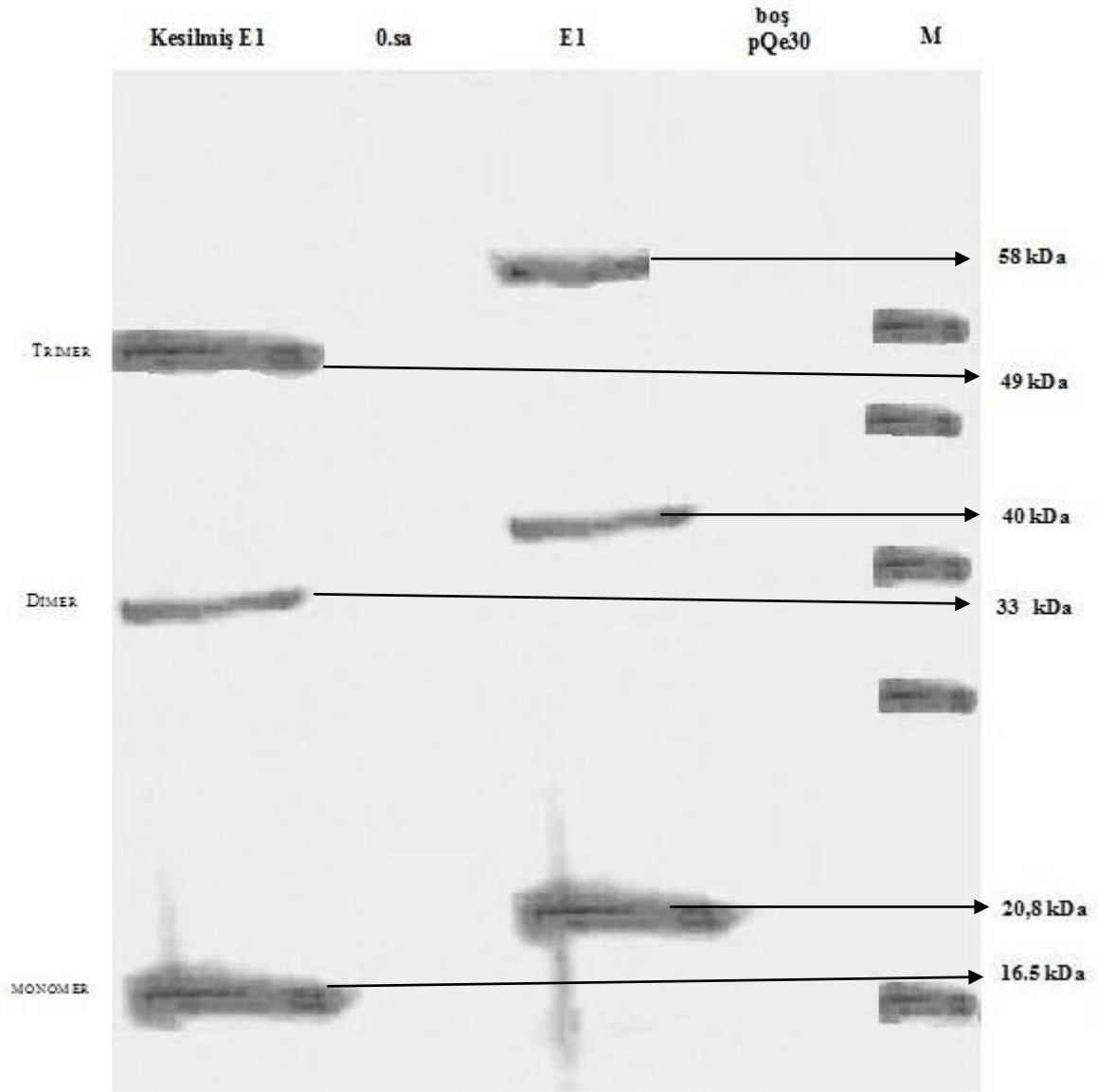


M: Fermantas #SM0 0441



M : Fermantas #SM 0671

Şekil 16 : Rekombinant Kesik E1 ve E1 Preparatının SDS PAGE Analizi



M: Fermantas #SM 0671

Şekil 17: E1 proteinlerini eksprese eden hücre lizatlarının ürünlerine ait Hasta serum anti-korları ile yapılan *Western blotlama* fotoğrafı.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın temel amacı, Türkiye kaynaklı HCV genotip 1b kökeninden elde edilmiş E1 proteininin saflaştırılarak üretilmesi ve elde edilen bu proteine karşı immünolojik bir yanıtın kullanılabilir olup olmadığının araştırılmasıdır. Elde edilen rekombinant E1 proteinleri ileri tanı ve immünolojik çalışmalarda önemli araçlardan biri olabilir. HCV'nin E1 proteinlerinin elde edilmesi için literatürde kullanılan yöntemlerde olduğu gibi, çok basamaklı bir deney sistemi kullanılmıştır. Bu basamaklar sırasıyla, “nested” PZT, klonlama, protein ekspresyonu, *SDS PAGE* ve *Western Blot* deney basamaklarıdır (132,133)

Çalışmada, viral genomun kaynağı olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı koleksiyonundaki bir HCV genotip 1b kökenine ait HCV RNA kullanılmıştır. Bu kökenin seçilmesinin nedeni, Türkiye’de rastlanan HCV genotiplerinin arasında 1b kökeninin en yaygın olduğunun bildirilmesidir (134).

Literatürde E1 viral zarf glikoproteininin tamamının prokaryotik ifade sistemlerinde elde edilmesinde teknik sorunlar yaşandığı bildirilmiştir. Bu nedenle şimdiye dek E1 proteininin C- terminalindeki hidrofobik özellik gösteren aminoasit dizilerini kodlayan kısımlar çıkartılarak hazırlanan kesik E1’in ifadesi ile ilgili yayınlar vardır. Bu tezde, ulaşılan literatürden farklı olarak ilk kez E1’in tamamı prokaryotik ifade sisteminde elde edilmiştir. Konu ile ilgili yayınlanmış olan çalışmalarda C- terminal bölgesindeki 43 aminoasit eksiltiyle ifade ettirildiği bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda 584 nükleotidlik tam uzunluktaki HCV E1 ve C-terminal bölgesi eksik (son 43 aminoasit) HCV E1 proteini M15 *Escherichia coli* hücrelerinde ifade ettirilerek büyük miktarda üretilmiş ve elde edilen E1 proteinleri ile hasta serumunda immünolojik aktivitesi gösterilmiştir (132,135)

Çalışmada ilk basamak olan Polimeraz Zincir Tepkimesi, duyarlılığı arttırmak amacı ile iki basamaklı “nested” PZT olarak tasarlanmıştır. Daha önce de bu stratejinin başka araştırmacılar tarafından rekombinant E1 proteinini saflaştırılmasında kullanıldığı bildirilmiştir (136).

Klonlama için kullanılacak ürünlerin elde edildiği PZT işlemlerinde, Taq DNA polimeraz kullanılmıştır. Wael Saad El-Sayed Abdel-Mageed ve arkadaşları da Taq DNA polimeraz ile tam uzunluktaki HCV E1 proteinini bir bitkisel ifade sisteminde gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir (137). Optimizasyon sırasında PZT nin çalışılacağı program, kullanılan primerlerin ürünü yakaladığı sıcaklığa göre belirlenmiştir.

Transformasyon optimizasyonu sırasında, ilk aşamada tam uzunluktaki E1 proteini için, istenilen rekombinant DNA ürünleri elde edilememiştir. Kullanılan restriksiyon enzimleri BamHI ve HindIII ile vektör plazmid pQE30 ayrı ayrı kesilip 'lineer' hale getirilerek enzim etkinliği değerlendirilmiştir. PZT ürününden yaptırılan DNA dizi analizi sonuçlarına göre BamHI enziminin ürünü 2 farklı yerden kestiği tespit edilmiştir. SphI kullanılarak yapılan restriksiyon analizlerinde hem tam E1 hem de kesik E1 ürünlerinde BamHI kullanıldığında karşılaşılan kesim problemleri yaşanmamıştır.

Çalışmamızda daha önce yayınlanmış çeşitli araştırmalarda da bildirilen prokaryotik ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Bunun için vektör olarak pQE30 plazmiti ve transformasyon için M15 *E.coli* suşu kullanılmıştır. Bu sistemin ökaryotik hücrelerde olan posttranslasyonel modifikasyonlarının olmaması, rekombinant proteinin inklüzyon cisimcikleri içinde bulundurulması gibi dezavantajlarına rağmen önemli avantajları da vardır. Bunlardan en önemlisi rekombinant protein ekspresyonunun ökaryotik sistemlere göre çok yüksek olmasıdır. Ayrıca uygulamasının kolay ve ucuz olması, *E.coli* 'nin özelliklerinin çok iyi biliniyor olması diğer avantajlarıdır. Bu vektördeki protein ekspresyonu lac operonu tarafından düzenlenmektedir. Protein ekspresyonunda JM109 gibi başka *E.coli* suşlarında kullanılabilir. Fakat JM109'da her ne kadar kromozomal olarak bir lac süpresörü bulunsada, uyarım öncesi başlangıç bazal protein ekspresyonunu yeterince baskılayamayabilir. Bu yüzden ekspresyon deneylerinde, içerisinde güçlü bir lac süpresörü bulunduran plazmide sahip M15 *E.coli* hücreleri tercih edilmiştir. Bu suş bazal protein ekspresyonunu yeterince baskılayabilmektedir (138).

Protein üretimine geçmeden önce klonlanan dizinin vektörün klonlama bölgesine yerleştiğinin dizi analiziyle doğrulanması gerekmektedir. Bir bazlık bir hata bile çerçeve kayması denilen mutasyona neden olmaktadır. Çerçeve kayması okuma esnasında üçlü kodonların kaymasıyla sonuçlanır, böylece aminoasit kodlamalarında hatalar olur ve istenilen protein doğru şekilde sentezlenemez. Bu tip mutasyon bütün aminoasit dizisini aşağı doğru kaydırır ve normal proteinden çok farklı yapıda fonksiyonsuz bir protein oluşturur. Bu çalışmada da, pQE30 vektörüne ait dizileme öncüllerinin kullanıldığı DNA dizi analizi ile klonlanan pQE-E1 in çerçeveye uygun şekilde oturtulduğu doğrulanmış ve daha sonra protein üretimine geçilmiştir.

Eksprese edilen rekombinant tam uzunluktaki E1 ve C- Terminal kısmı kesilmiş E1 proteinlerinin amino ucunda 6X-His tag'lı protein şeklinde sentezlenmiştir. Bu şekilde sentezlenmesinin nedeni, saflaştırılma basamağında 6 adet Histidin molekülü taşıyan proteinleri-

ni kolona yapıştırmak ve spesifik olmayan proteinleri tamamen ortadan kaldırmaktır. Protein sentez optimizasyonu sırasında laktoz analogu olan IPTG indüksiyonuyla en verimli protein ekspresyonu 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9. saatler ve bir gecede indüksiyona bakılarak tesbit edilmiştir (139). Yapılan deneyler sonucunda tam uzunluktaki E1 proteinin 7. saatte C- Terminal kısmı kesilmiş E1 proteinin en iyi 3. saatte eksprese olduğu gösterilmiştir.

Tam uzunluktaki E1 proteininin bakteriyel ekspresyonu zordur. Bunun nedeni, tam uzunluktaki E1 proteinine ait son 43 aminoasitin proteine hidrofobik bir özellik kazandırmasıdır. Bu hidrofobik bölgelerin bakterinin membran geçirgenliğini bozduğu ve bakterilere toksik etki yaptığı literatürde açık şekilde bildirilmiştir. Bu nedenle de tam uzunluktaki E1 proteininin *E.coli* hücrelerinde eksprese edilemediği bildirilmiştir (140). Çalışmanın ekspresyon optimizasyonu sırasında bu sorunla karşılaşmıştır. Ekspresyon sorunun çözmek için, kodon optimizasyonu yapılmıştır ve ekspresyon başarılı bir biçimde gerçekleştirilmiştir. *E.coli* ökaryotlarda bulunan bazı kodonları, zayıf olarsak algılar ve bu durumda translasyon durur, protein sentezi gerçekleşmez. Bu durumu engellemek için kodon optimizasyonu yapılmaktadır. Optimizasyon, M 15 *E.coli* içerisine P-rare vektörü eklenerek gerçekleştirilmiştir. Bu vektörü eklememizin amacı, *E.coli* deki bilinen zayıf translasyon bölgelerini bakteriye transfer etmektir. Böylelikle bakteri eksik kaldığı kodonlar tarafından tamamlanmış olur. Bu önlem alındıktan sonra tam uzunluktaki E1 proteininin eksprese edilmiştir. C terminal bölgesi kesik E1 için de kodon optimizasyonu yapılmıştır fakat kodon optimizasyonu yapılmadan gerçekleştirilen protein ekspresyonu ile karşılaştırıldığında sonuç değişmemiştir. Protein ekspresyonun 3. saatte her iki şekilde de yüksek olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı deneylerle gösterilmiştir (138).

Ekspresyon sırasında proteinler tarafından sitoplazmada oluşturulan inklüzyon cisimciklerinin saflaştırılma aşamasına geçilmeden önce parçalanması gereklidir. Bunun için 8 M üre'li yıkım (Lizis) tamponu (pH 8.0) kullanılmıştır. Bu aşamada rekombinant proteinlerin parçalanmasını önlemek amacıyla lizis tamponunun içine proteaz inhibitör kokteyli eklenmiştir. *E. coli* süspansiyonlarının hazırlanan tampon içerisinde 1 saat 200 rpm'lik karıştırma ve sonikasyon işlemleri ile inklüzyon cisimlerinin açılması sağlanmıştır. Proteinin parçalanmadan korunması için bütün adımlar +4°C' de yapılmıştır (139).

http://pir.georgetown.edu/cgi-bin/comp_mw.pl adresinden aminoasit dizilimine göre protein ağırlığı hesaplanan tam uzunluktaki ve C Terminal bölgesi kesilmiş rekombinant E1 proteinlerin büyüklükleri sırasıyla 20.8 kDa ve 16.5 kDa dur. Bakterilerde üretilen

rekombinant proteinler SDS PAGE yöntemiyle bant büyüklükleri bilinen bir ‘marker’ la yürütölüp, proteinlerin varlığı bu yöntemle gösterilmiştir. Bu yöntemdeki amaç, proteinleri sodyum dodesil sülfatla kaplayıp yüklerini eşitlemek ve elektroforez ortamında proteinleri sadece büyüklüklerine göre yürütmektir. Bu yöntemin uygulanması sırasında bilinmesi gerekenler, tamponların doğru şekilde hazırlanması, saklanması, jellerin protein büyüklüklerine göre dökülmesi, dondurulması ve proteinlerin en doğru akım şiddeti ve voltta yürütüleceğinin bilinmesidir. Bunun içinde optimizasyon çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

SDS PAGE yöntemiyle 20,8 ve 16,5 kDa büyüklüğündeki proteinlerin varlığı gösterilmiştir. Bunlar bakterinin yapısından gelen aynı büyüklükteki proteinler olmadığını kanıtlamak amacıyla, bakteriye boş vektör aktararak, eksprese edilmiş, SDS PAGE ile yürütölmüştür. Elde edilen rekombinant proteinlerin viral E1 proteini olduğundan emin olabilmek için *Western Blot* tekniğı kullanılmıştır. Bu yöntemin birçok basamağı vardır. Bu basamakların her biri optimize edilerek bir sonraki basamağına geçilmiştir. *Westen blottaki* en önemli noktalardan ilki, jeldeki proteinleri membrana aktarmaktır. Aktarma işlemi elektroblotting yöntemiyle yarı kuru olarak gerçekleştirilmiştir. Aktarım sırasında kullanılan tamponların konsantrasyonları çok önemlidir ve kullanılacak konsantrasyonlar litetatür ışığında belirlenmiştir. Jeldeki proteinlerin hepsinin membrana aktarıldığını anlamak için jel Coomassive Blue boyasıyla boyanmıştır. Ayrıca membranda marker bantlarının düzgün şekilde gözle görölmesi bunun bir kanıtı olarak düşünebilir. Proteinleri bloklama sırasında %5 lik süt tozu kullanılmıştır. Bir sonraki basamak olan primer antikörle bağlamaya gelindiğinde, eldeki primer antikörün çalışmadığı ve tam uzunluktaki E1 proteinine uygun olmadığı yapılan deneyler sonucunda gösterilmiştir ve primer antikör olarak Hepatit C Virüs le enfekte bir hasta serumu kullanılmıştır. Optimum antikör dilüsyonu yapılan *dot blot* deneyleriyle 1/1000 bulunmuştur. Primer antikörle muamale işlemi soğuk odada bir gece inkübasyonla gerçekleştirilmiştir. Optimum sekonder antikori isaretli anti-Human IgG konsantrasyonu dot blot yöntemiyle 1/5000 bulunmuştur ve oda ısısında 1 saat muamele yapıldıktan sonra, çalkalanarak yıkanmıştır. Bu basamakta yıkama tamponunun 10 dakika bir değıştirilmesi, iyice yıkanması spesifik olmayan bağlantıları önlenmesi açısından çok önemlidir. Membran yaban turpu peroksidaz ile tepkimeye giren 4 kloro 1 alfa naftol substratı ile kaplanarak, görüntölünmüştür. Bu yöntem ECL substratına göre daha az duyarlı bir yöntem olmasına karşın, ECL ile kemilümünasans görüntöllemelerde protein bantları aşırı yoğun görüntölendiğinden proteinler alfa naftolle gösterilmiştir fakat iki substratla da sonuç alınmıştır.

Membran üzerinde, tam uzunluktaki rekombinant E1 ve C terminal bölgesi kesik E1 proteinlerine bantlar görüntülenmiştir. Doğru büyüklükte olan bantların yanı sıra, bantların iki katı ve üç katı büyüklüğünde bantlar gözlemlenmiştir.

Bu bantlar, proteinlerin dimer ve trimer formları olarak yorumlanmıştır. Çünkü E1 proteinin trimerik bir yapıda olduğu bilinmektedir. Bu sonuç bize doğadakine yakın iyi bir sonuç elde ettiğimizin göstergesidir. Yu-Ying Kong ve arkadaşları da, bizim çalışmamızla benzer şekilde kesik E1 proteininin *E.coli* bakteriyal protein ekspresyonunu *Westerm Blot* yöntemiyle göstermiş ve benzer sonuçlar yayınlamışlardır (132).

Çalışmada, şimdiye dek ülkemizde ve uluslar arası literatürde yayınlanmış veriler üzerinde yaptığımız taramalarda ilk kez ülkemizden bir HCV genotip 1b kökenine ait tam uzunluktaki E1 proteini ve hidrofobik kısmı kesik E1 proteini prokaryotik sistem ile eksprese edilmiş ve bu rekombinant E1 proteinlerine karşı hasta serumunda spesifik antikor yanıtı gösterilmiştir. Bu yanıt anlamlı bir yanıttır. Yayınlanan çalışmalarda hem prokaryotik hem de ökaryotik ekspresyon sistemleriyle elde edilen kesik E1 proteinine karşı alınan immünolojik yanıtların benzer olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hem ökaryotik hem de prokaryotik E1 in identik epitopları paylaştığı yayınlanmıştır. Zarf proteinlerini hedef alan HCV aşısı çalışmalarında genellikle post translasyonel modifikasyonların önemsenmesi nedeniyle ökaryotik sistemlerde ifade edilen glikozillenmiş proteinlere odaklanılmıştır. Buna rağmen, bakteri kaynaklı glikozillenmemiş kesik E1 proteinlerini kullanan bazı çalışmalarda da proteinin immunojenik özelliklerinin korunabileceği öngörülerek bunların test edilmesi gerektiği vurgulanmaktadır (132,136).

Çalışmamızda proteinlerin saflaştırılması optimize edilememiştir, bunun için yapılacak yeni çalışmalarda füzyon proteinleri kullanarak protein stabilize edilebilir. Bu füzyon proteinleri saflaştırmayı kolaylaştırır ve rekombinant proteinleri çözülebilir hale getirilerek, miktarlarını arttırabilirler. Prokaryotlar rekombinant E1 proteini doğru katlayabilir, fakat disülfid bağlarının sayısı üretilen protein miktarını azaltır. Membran proteinlerinin, prokaryotik ekspresyonu yapılacaksa bunlar dikkate alınmalıdır (141).

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatür taramasında her ne kadar HCV viral zarf glikoproteinlerinden E1'in prokaryotik sistemlerde tam uzunluk olarak ifadesinin zor olduğu ve bu nedenle hidrofobik C terminal bölgesi çıkarılarak daha rahat ifade ettirilebileceği bildirilse de bu çalışmada yapılan optimizasyon çalışmaları ve yöntem modifikasyonları ile E1 ilk kez bir prokaryotik sistemde tam uzunluk olarak ifade ettirilebilmiştir. Ayrıca hidrofobik C terminal bölümü çıkarılmış E1' de ifade ettirilmiştir. Her iki uzunluktaki E1 ile de hasta serumundaki antikorlarla reaksiyon gösterilmiştir. Burada tam E1'in daha fazla epitop içermesi ve doğal viral proteine daha yakın olması nedeniyle avantajlı olabileceği düşünülmekle birlikte bu önermelerin ileri çalışmalarda test edilmesi gerekmektedir.

HCV nin hücreye tutunması ve hücreye girişinde rol oynayan zarf glikoproteinlerinin yapılarının ve fonksiyonlarının anlaşılması, enfeksiyonun erken evrelerinde müdahale açısından çok önemlidir. Bu proteinlere karşı alınan bağışık yanıtlar tedavide kullanılacak olan stratejileri daha iyi belirleyebilecektir. Tam anlamıyla fonksiyonları bilinmeyen bu önemli proteinlerin anlaşılması için detaylı çalışmalara devam edilmelidir. Bu proteinlerin aşı çalışmaları için önemi büyüktür.

7.KAYNAKLAR

1. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003;125:808.
2. Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol.* 2008 Aug;128(2):133-47.
3. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2007 Jun;42(6):411-23.
4. Pai M, Joshi R, Dogra S, Mendiratta DK, Narang P, Dheda K, Kalantri S. Persistently elevated T cell interferon-gamma responses after treatment for latent tuberculosis infection among health care workers in India: a preliminary report. *J Occup Med Toxicol.* 2006 May 23;1:7
5. A.Op De Beeck, L. Cocquerel, J. Dubuisson, Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins, *J. Gen. Virol.* 82 (Pt 11) (2001)2589–2595.
6. Cocquerel L, Meunier JC, Pillez A, Wychowski C, Dubuisson J. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol* 1998;72:2183–2191.
7. Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, Penin F, Dubuisson J. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol* 2000;74:3623–3633.
8. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359–62. Kolykhalov, A. A., Agapov, E. V., Blight, K. J., Mihalik,
9. Yanagi, M., Purcell, R. H., Emerson, S. U. and Bukh, J.(1997) Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 8738–874
10. Lindenbach, B. D. *et al.* Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623–626(2005).
11. Pietschmann, T. *et al.* Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 7408–7413 (2006)
12. Darius Moradpour, François Penin and Charles M. Rice, Replication of hepatitis C virus. *Nature Reviews microbiology*, volume 5 | june 2007

13. Cai, Z., Zhang, C., Chang, K. S., Jiang, J., Ahn, B. C., Wakita, T., Liang, T. J. and Luo, G. (2005) Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J. Virol.* **79**, 13963–13973
14. F. Helle and J. Dubuisson. Hepatitis C virus entry into host cells, Review, Cellular and Molecular Life Sciences 2007
15. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/mono100B-8.pdf>
16. Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol.* 2002 Dec;39(9):531-6
17. Alexander A. Kolykhalov, Kathy Mihalik, Stephen M. Doi, Feinstein and Charles M. Rice, Hepatitis C Virus-Encoded Enzymatic Activities and Conserved RNA Elements in the 3' Nontranslated Region Are Essential for Virus Replication In Vivo. *J. Virol.* 2000, 74(4):2046
18. Neumann, A. U. *et al.* Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. *Science* **282**, 103–107 (1998).
19. M. Martell, J.I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia, J. Gomez, Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution, *J. Virol.* 66 (1992) 3225–3229.
20. C. Wang, P. Sarnow, A. Siddiqui, Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism, *J. Virol.* 67 (1993) 3338–3344.
21. M. Honda, M.R. Beard, L.H. Ping, S.M. Lemon, A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation, *J. Virol.* 73 (2) (1999) 1165–1174.
22. First Specific Drugs Raise Hopes for Hepatitis C, www.sciencemag.org, 8.04.2011
23. Afdhal, N. H. 2004. The natural history of hepatitis C. *Semin Liver Dis* 24 Suppl 2:38.
24. Ozsoy MF, Oncul O, Cavuslu S, Erdemoglu A, ve ark. Seroprevalences of hepatitis B and C among health care workers in Turkey. *J Viral Hepat.* 2003;10:150-156
25. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ Global epidemiology of hepatitis C virus infection. (2005). *Infectious Disease* (2005)
26. Alberti, A., L. Chemello, and L. Benvegna. 1999. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 31 Suppl 1:17-24.
27. Alter, M. J. 1997. Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology* 26:62S-65S.

28. Cerny, A., and F. V. Chisari. 1999. Pathogenesis of chronic hepatitis C:immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 30:595-601Colombo, M. 1999.
29. Natural history and pathogenesis of hepatitis C virus related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 31 Suppl 1:25-30.
30. Leroux-Roels, G. 2005. Development of prophylactic and therapeutic vaccines against hepatitis C virus. *Expert Rev Vaccines* 4:351-71.
31. Dienstag, J. L., and J. G. McHutchison. 2006. AmericanGastroenterological Association technical review on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 130:231-64; quiz 214-7.
32. Heathcote, J., and J. Main. 2005. Treatment of hepatitis C. *J Viral Hepat* 12:223-35.
33. Genovese, D., Angelico, M. and Rapicetta, M. Molecular epidemiology of hepatitis C virus genotype 4 isolates in Egypt and analysis of the variability of envelope proteins E1 and E2 in patients with chronic hepatitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:1902-1909. (2005)
34. Kabir, A., S. M. Alavian, and H. Keyvani. 2006. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients infected by different sources and its correlation with clinical and virological parameters: a preliminary study. *Comp Hepatol* 5:4.
35. McOmish, F., P. L. Yap, B. C. Dow, E. A. Follett, C. Seed, A. J. Keller, T. J. Cobain, T. Krusius, E. Kolho, R. Naukkarinen, and et al. 1994.Geographical distribution of hepatitis C virus genotypes in blood donors: an international collaborative survey. *J Clin Microbiol* 32:884-9
36. *Review Article* Evolving Trends in the Hepatitis C VirusMolecular Epidemiology Studies: From the Viral Sequences to the Human Genome Julieta Trinks,¹ Adri ´an Gadano,² and Pablo Argibay¹, 16 January 2012
37. Bukh, J., R. H. Purcell, and R. H. Miller. 1993. At least 12 genotypes of hepatitis C virus predicted by sequence analysis of the putative E1 gene of isolates collected worldwide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8234-8.
38. Cha, T. A., E. Beall, B. Irvine, J. Kolberg, D. Chien, G. Kuo, and M. S. Urdea. 1992. At least five related, but distinct, hepatitis C viral genotypes exist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7144-8.
39. Simmonds, P., E. C. Holmes, T. A. Cha, S. W. Chan, F. McOmish, B.Irvine, E. Beall, P. L. Yap, J. Kolberg, and M. S. Urdea. 1993. Classification of hepatitis C virus into

six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 74 (Pt 11):2391-9.

40. HCV Diagnostic Tools:Genotype, Subtype& Quasispecies, Hepatitis C Support Project • www.hcvadvocate.org
41. Richter SS. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol.* 2002 Dec;40(12):4407-12.
42. http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/PDFs/hcv_flow.pdf
43. Mario G.,Pessoa, Hugo Cheinder.Re treatment ofprevious non responders and relapers to interferon plus ribavirin with pegininterferon randomized multicentre clinical trial.*Annals of hepatology*,2012
44. Jay, H. and Leonard, S. (2006) Peginterferon and Ribavirin for Chronic Hepatitis C. *The New England Journal of Medicine*, 355:24444 -22451.
45. Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, Mauss S, Wedemeyer H, Sarrazin C, Hueppe D, Zehnter E, Manns MP. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2009 Feb;16(2):75-90.
46. Alter MJ. Prevention of spread of hepatitis C. *Hepatology.* 2002;36:93-98
47. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 1994;68:3631-3641
48. S. Harada, Y.Watanabe, K. Takeuchi, T. Suzuki, T. Katayama, Y. Takebe, I. Saito, T. Miyamura, Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells, *J. Virol.* 65 (1991) 3015–3021.
49. K. Yasui, T. Wakita, K. Tsukiyama-Kohara, S.I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein, *J. Virol.* 72 (7) (1998) 6048–6055.
50. T. Suzuki, R. Suzuki, Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein, in: M. Kalitzky, P. Borowski (Eds.), *Molecular Biology of the Flavivirus*, Horizon Bioscience, Norfolk, U.K., 2006, pp. 295–311.
51. Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M. and Dubuisson, J. (1997)Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 78, 2299–2306
52. Patel, J., Patel, A. H. and McLauchlan, J. (2001) The transmembrane domain of the hepatitis C virus E2 glycoprotein is required for correct folding of the E1 glycoprotein and native complex formation. *Virology* 279, 58–68

53. Cocquerel, L., Quinn, E. R., Flint, M., Hadlock, K. G., Fong, S. K. and Levy, S. (2003) Recognition of native hepatitis C virus E1E2 heterodimers by a human monoclonal antibody. *J. Virol.* 77, 1604–1609
54. R. Roccasecca, H. Ansuini, A. Vitelli, A. Meola, E. Scarselli, S. Acali, M. Pezzanera, B.B. Ercole, J. McKeating, A. Yagnik, A. Lahm, A. Tramontano, R. Cortese, and A. Nicosia, Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain-specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J. Virol.*, 77: 1856–1867, 2003.
55. Forns X, Thimme R, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Chisari FV, Bukh J. Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13318-13323
56. Lo, Y., Selby, J. and Ou, H. (1996) Interaction between Hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *Journal of Virology*, 70:5177-5182.
57. Callens N, Ciczora Y, Bartosch B, Vu-Dac N, Cosset FL, Pawlotsky JM, Penin F, Dubuisson J. Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* 2005; 79: 15331-15341
58. Penin F, Combet C, Germanidis G, Frainais PO, Deleage G, Pawlotsky JM. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol* 2001; 75: 5703-5710
59. Zibert A, Kraas W, Meisel H, Jung G, Roggendorf M. Epitope mapping of antibodies directed against hypervariable region 1 in acute self-limiting and chronic infections due to hepatitis C virus. *J Virol* 1997;71:4123–4127.
60. L. Frasca, P. Del Porto, L. Tuosto, B. Marinari, C. Scotta, M. Carbonari, A. Nicosia, and E. Piccolella, Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells. *J. Immunol.*, 163: 650–658, 1999.
61. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. [Hepatitis C viral life cycle](#). *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Oct 10;59(12):1200-12. Epub 2007 Aug 9. Review.
62. Griffin SD, Harvey R, Clarke DS, Barclay WS, Harris M, Rowlands DJ. A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protein is required for amantadine-sensitive ion channel activity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria. *J Gen Virol* 2004; 85: 451-461

63. Premkumar A, Wilson L, Ewart GD, Gage PW. Cation-selective ion channels formed by p7 of hepatitis C virus are blocked by hexamethylene amiloride. *FEBS Lett* 2004; 557: 99-103
64. Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000; 290: 1972-1974
65. Lohmann V, Korner F, Koch J, Herian U, Theilmann L, Bartenschlager R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285: 110-113
66. Francoise Lunel Fabiani, Professor, Series Editor, Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 2007 May 7; 13(17): 2406-2415 www.wjgnet.com *World Journal of Gastroenterology* ISSN 1007-9327
67. Briana M. Weiser, Timothy L. Tellinghuisen*Structural biology of the hepatitis C virus proteins . Vol. xxx, No. xx 2011
68. Frick DN. The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. *Curr Issues Mol Biol.* 2007 Jan;9(1):1-20.
69. Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, Sung VM et al. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 2006; 80: 7199–7207.
70. Wolk, B., Sansonno, D., Krausslich, H. G., Dammacco, F., Rice. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J. Virol.* (2000) 74, 2293–2304
71. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J. and Jacobsen, H. (1994) Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J. Virol.* 68, 5045–5055
72. Lin, C., Thomson, J. A. and Rice, C. M. (1995) A central region in the hepatitis C virus NS4A protein allows formation of an active NS3-NS4A serine proteinase complex in vivo and in vitro. *J. Virol.* 69, 4373–4380
73. Koch, J. O. and Bartenschlager, R. (1999) Modulation of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by nonstructural proteins NS3, NS4A, and NS4B. *J. Virol.*, 7138–7146
74. Lindenbach, B. D., Pragai, B. M., Montserret, R., Beran, R. K., Pyle, A. M., Penin, F. and Rice, C. M. (2007) The C-terminus of hepatitis C virus NS4A encodes an electrostatic switch that regulates NS5A hyperphosphorylation and viral replication. *J. Virol.* 81, 8905–8918

75. Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D. and Bienz, K. (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J. Virol.* 76, 5974–5984
76. Einav, S., Gerber, D., Bryson, P. D., Sklan, E. H., Elazar, M., Maerkl, S. J., Glenn, J. S. and Quake, S. R. (2008) Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat. Biotechnol.* 26, 1019–1027
77. Einav, S., Elazar, M., Danieli, T. and Glenn, J. S. (2004) A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J. Virol.* 78, 11288–11295
78. Stone, M., Jia, S., Heo, W. D., Meyer, T. and Konan, K. V. (2007) Participation of rab5, an early endosome protein, in hepatitis C virus RNA replication machinery. *J. Virol.* 81, 4551–4563
79. T.L. Tellinghuisen, J. Marcotrigiano, A.E. Gorbalenya, C.M. Rice, The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein, *J. Biol. Chem.* 279 (47) (2004) 48576–48587.
80. Huang, L., Hwang, J., Sharma, S. D., Hargittai, M. R., Chen, Y., Arnold, J. J., Raney, K. D. and Cameron, C. E. (2005) Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 280, 36417–36428
81. Evans, M. J., Rice, C. M. and Goff, S. P. (2004) Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 13038–13043
82. Gao, L., Aizaki, H., He, J.W. and Lai, M. M. (2004) Interactions between viral nonstructural proteins and host protein hVAP-33 mediate the formation of hepatitis C virus RNA replication complex on lipid raft. *J. Virol.* 78, 3480–3488
83. Ranjith-Kumar, C. T., Kim, Y. C., Gutshall, L., Silverman, C., Khandekar, S., Sarisky, R. T. and Kao, C. C. (2002) Mechanism of de novo initiation by the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase: role of divalent metals. *J. Virol.* 76, 12513–12525
84. Robida, J. M., Nelson, H. B., Liu, Z. and Tang, H. (2007) Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro. *J. Virol.* 81, 5829–5840
85. Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B. & Zhang, Q. X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12766–12771 (1999).
86. Scarselli, E. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* 21, 5017–5025 (2002).

87. Evans, M. J. et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801–805 (2007).
88. Tscherne, D. M. et al. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH triggered entry. *J. Virol.* 80, 1734–1741 (2006).
89. Siridechadilok, B., Fraser, C. S., Hall, R. J., Doudna, J. A. & Nogales, E. Structural roles for human translation factor eIF3 in initiation of protein synthesis. *Science* 310, 1513–1515 (2005).
90. Darius Moradpour, François Penin and Charles M. Rice, Replication of hepatitis C virus. Chapter 7
91. Miles JS, Wolf CR. Principles of DNA cloning. *BMJ.* 1989;299:1019-1022
92. T.A. Brown. Gene Cloning & DNA Analysis 2006
93. Dr.Hakan taşkın, uzmanlık tezi, 2010 mart
94. Cécile Voisset, Jean Dubuisson. Review, Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biology of the Cell* 96 (2004) 413–420. www.sciencedirect.com
95. P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G. & Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938-941.
96. Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., Burgio, V., Di Stasio, E., Giardina, B., Houghton, M., Abrignani, S. & Grandi, G. (2000). Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol* 74, 4824-4830.
97. B., Bukh, J., Meunier, J. C., Granier, C., Engle, R. E., Blackwelder, W. C., Emerson, S. U., Cosset, F. L. & Purcell, R. H. (2003a). In vitro assay for neutralizing antibody to hepatitis C virus: evidence for broadly conserved neutralization epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14199-14204.
98. (Flint, M., von Hahn, T., Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C. T., Balfe, P., Rice, C. M. & McKeating, J. A. (2006). Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J Virol* 80, 11331-11342.
99. Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J., Wolk, B., Tellinghuisen, T. L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R. O., Burton, D. R., McKeating, J. A. & Rice, C. M. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309, 623-626.
100. Ania M. Owsianka, Judith M. Timms, Alexander W. Tarr, Identification of Conserved Residues in the E2 Envelope Glycoprotein of the Hepatitis C Virus That Are Critical for CD81 Binding. *J Virol*, 2006, 80(17)

101. Costin-Ioan Popescu and Jean Dubuisson. Role of lipid metabolism in hepatitis .Biol.
102. Barth, H., Cerino, R., Arcuri, M., Hoffmann, M., Schurmann, P., Adah, M. I., Gissler ,B., Zhao, X ., Ghisetti, V. Lavezzo, B., Blum, H. E., von Weizsacker, F., Vitelli,A., Scarselli, E. & Baumert, T. F. (2005). Scavenger receptor class B type I and hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes. J Virol 79, 5774.
103. Zheng, A., Yuan, F., Li, Y., Zhu, F., Hou, P., Li, J., Song, X., Ding, M. & Deng, H.(2007). Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. J Virol 81, 12465-12471.
104. Harris, H. J., Davis, C., Mullins, J. G., Hu, K., Goodall, M., Farquhar, M. J., Mee, C .J., McCaffrey, K., Young, S., Drummer, H., Balfe, P. & McKeating, J. A.Claudin association with CD81 defines hepatitis C virus entry. J Biol Chem.
105. Barth, H., Schafer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H.,. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. J Biol Chem 278, 41003-41012.
106. Sonia Molina^{1,2,,} Vale'rie Castet^{1,2,,} Chantal Fournier-Wirth^{1,2,3,}Lydiane Pichard-Garcia^{1,2,} Rachel Avner^{4,}The low-density lipoprotein receptor plays a role in the infection of primary human hepatocytes by hepatitis C virus . Journal of Hepatology 46 (2007) 411–419
107. .Zeisel, M. B. & Baumert, T. F. (2009). HCV entry and neutralizing antibodies: lessons from viral variants. Future Microbiol 4, 511-517.
108. Forns, X., Thimme, R., Govindarajan, S., Emerson, S. U., Purcell, R. H., Chisari, F.V. & Bukh, J. (2000). Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 13318-13323.
109. .Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A. & Cosset, F. L. (2003c). Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. J Biol Chem 278, 41624-41630.
110. Dreux, M. & Cosset, F. L. (2007). The scavenger receptor BI and its ligand, HDL;partners in crime against HCV neutralizing antibodies. J Viral Hepat 14 Suppl 1, 68-76.
111. Emmanouil Kochlios, Pelagia Foka and Penelope Mavromara, Modulation of monocyte/macrophage-derived cytokine and chemokine expression profile by

persistent Hepatitis C virus (HCV) infection leads to chronic inflammation Greece. Journal of Molecular Biochemistry, 2012

112. El Awady, K., El Abd, S., Shoeb, A., Tabll, A., Hosny Ael, D., El Shenawy, M., Atef, K. Bader El Din, G. And Bahgat, M. (2006) Circulating viral core and E1 antigen levels as supplemental markers for HCV chronic hepatitis. Virology Journal, 3: 1743-1752.
113. Dimitri, L., Peggy, D., Judith, F., Jennifer, M., Romuald, C., Marlene, D., Francois, P. and Francois, C. (2007) Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. Journal of Virology, 81:8752-8765.
114. Hsiao-Fen, L., Li-Shuang, A., Chin-Kai, C. and Steve, S. (2009) Mutagenesis of the fusion peptide-like domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein: involvement in cell fusion and virus entry. Journal of Biomedical Science, 16(89):1 :18.
115. Keck, Z., Sung, V., Perkins, S., Rowe, J., Paul, S., Liang, T., Lai, M. and Fount, S. (2004) Human monoclonal antibody to hepatitis C virus E1 glycoprotein that blocks virus attachment and viral infectivity. Journal of Virology, 78:7257-7263.
116. Li, H., McMahon, B., McArdle, S., Bruden, D., Sullivan, D., Shelton, D., Deubner, H. and Gretch, D. (2008) Hepatitis C virus envelope glycoprotein co-evolutionary dynamics during chronic hepatitis C. Virology, 375:580-591.
117. Bruni, R., Costantino, A., Tritarelli, E., Marcantonio, C., Ciccozzi, M., Rapisetta, M., El Sawaf, G., Giuliani, A. and Ciccaglione, A. (2009) A computational approach identifies two regions of hepatitis C virus E1 protein as interacting domains involved in viral fusion process. BMC Structural Biology, 9:6807:6818.
118. Mottola, G., Jourdan, N., Castaldo, G., Malagolini, N., Lahm, A. A new determinant of endoplasmic reticulum localization is contained in the juxtamembrane region of the ectodomain of hepatitis C virus glycoprotein E1. Journal of Biological Chemistry, 275(31):24070-24079. (2000)
119. Liu, M., Chen, H., Luo, F., Li, P., Pan, Q., Xia, B., Qi, Z., Ho, W. and Zhang, X. (2007) Deletion of N-glycosylation sites of hepatitis C virus envelope protein E1 enhances specific cellular and humoral immune responses. Vaccine, 25(36):6572-6580.
120. Meunier, C., Fournillier, A., Choukhi, A., Cahour, A., Cocquerel, L., Dubuisson, J. and Wychowski, C. (1999) Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus

- (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *Journal of General Virology*, 80:887-896.
121. Lavie, M., Goffard, A. and Dubuisson, J. (2007) Assembly of a functional HCV glycoprotein heterodimer. *Current Issues of Molecular Biology*, 9(2):71-86.
 122. Duvet, S., Cocquerel, L., Pillez, A., Cacan, R., Verbert, A., Moradpour, D., Wychowski, C. and Dubuisson, J. (1998) Hepatitis C virus glycoprotein complex localization in the endoplasmic reticulum involves a determinant for retention and not retrieval. *Journal of Biological Chemistry*, 273(48):32088-32095.
 123. Op De Beeck, A., Montserret, R., Duvet, S., Cocquerel, L., Cacan, R., Barberot, B., Le Maire, M., Penin, F. and Dubuisson, J. (2000) The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *The Journal of Biological Chemistry*, 275:31428-3143
 124. Lavie, M., Goffard, A. and Dubuisson, J. (2006) HCV glycoproteins: assembly of a functional E1-E2 heterodimer. Chapter 4:121-150.
 125. Lo, Y., Selby, J. and Ou, H. (1996) Interaction between Hepatitis C virus core protein and E1 envelope protein. *Journal of Virology*, 70:5177-5182.
 126. Lanford, R., Chavez, D., Chisari, F. and Sureau, C. (1995) Lack of detection of negative-strand hepatitis C virus RNA in peripheral blood mononuclear cells and other extrahepatic tissues by the highly strand-specific rTth reverse transcriptase PCR. *Journal of Virology*, 69(12):8079-8083.
 127. Lin, Y., Kwon, T., Polo, J., Zhu, F., Coates, S., Crawford, K., Dong, C., Wininger,., McCoin, C., Ng, P., Drane, D., Chien, D., Han, J., Vajdy, M. and Houghton, M. (2008) Induction of broad CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses and cross-neutralizing antibodies against hepatitis C virus by vaccination with Th1-adjuvanted polypeptides followed by defective alphaviral particles expressing envelope glycoproteins gpE1 and gpE2 and nonstructural proteins 3, 4, and 5. *Journal of Virology*, 82(15):7492-7503.
 128. Qiu, P., Cai, X., Ding, W., Zhang, Q., Norris, E. and Greene, J. (2009) HCV genotyping using statistical classification approach. *Journal of Biomedical Science*, 16:62
 129. Stuyver, L., Van Arnhem, W., Wyseur, A., DeLeys, R. and Maertens, G. (1993) Analysis of the putative E1 envelope and NS4a epitope regions of HCV type 3. *Biochemical Biophysics Research*, 192(2):635-641.

130. Keck, Z., Sung, V., Perkins, S., Rowe, J., Paul, S., Liang, T., Lai, M. and Fong, S. (2004) Human monoclonal antibody to hepatitis C virus E1 glycoprotein that blocks virus attachment and viral infectivity. *Journal of Virology*, 78:7257-7263.
131. Meunier, C., Russell, S., Goossens, V., Priem, S., Walter, H., Depla, E., Union, A., Faulk, N., Bukh, J., Emerson, U. and Purcell, H. (2008) Isolation and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the E1 glycoprotein of hepatitis C virus. *Journal of Virology*, 82:966-97
132. Liu, J., Zhu, L., Kong, Y., Li, G. and Wang, Y. (2005) Purification and application of C-terminally truncated hepatitis C virus E1 proteins expressed in *Escherichia coli*. *World Journal of Gastroenterology*, 11(4):503-507.
133. Anna Rita Ciccaglione, Cinzia Marcantonio, Angela Costantino, Michele Equestre. Hepatitis C Virus E1 Protein Induces Modification of Membrane Permeability in *E. coli* Cells. *VIROLOGY* 250, 1–8 (1998)
134. Huseyin Şener Barut, Ozgur Gunal. Global and National Epidemiology of Hepatitis C. review
135. Peter Hussy¹, Heinrich Faust², Jean-Claude Wagner² Evaluation of hepatitis C virus envelope proteins expressed in *E. coli* and insect cells for use as tools for antibody screening *Journal of Hepatology* 1991; 26: 1179-1186
136. Marina Klein, January 2011, doctorate thesis
137. Wael Saad El-Sayed Abdel-Mageed, 2011, doctorate thesis, Egypt
138. Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2005;115:113-128
139. THE QIAEXPRESSIONIST™. QIAGEN 2003. S64
140. A. R. Ciccaglione, A. Costantino, C. Marcantonio, M. Equestre, A. Geraci and M. Mutagenesis of hepatitis C virus E1 protein affects its membrane-permeabilizing activity. *Rapicetta. Journal of General Virology* (2001), 82, 2243–2250
141. A.R. Ciccaglione, C. Marcantonio, E. Tritarelli, M. Equestre, The transmembrane domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein induces cell death. *Virus Research* 104 (2004)

8.EKLER

8.1.Etik Kurul Onayı

T.C. DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU Tarih ve Sayı: 29.12.2005/289 Etik Kurul Üyeleri Prof.Dr.Taner ÇAMSARI Doç. Dr. Cem Şeref BEDİZ Doç. Dr. Uğur MÜNGAN Doç. Dr. Hüseyin İŞLEKEL Doç. Dr. Arzu SAYINER Doç. Dr. Özgül SAĞOL Doç. Dr. Görsev YENER Doç. Dr. Mustafa SEÇİL Yardımcı Doç. Dr. Cenk ERDAL Erhan ÖZKUL Etik Kurul Sekreteri Hatice İGÇİ		DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA, Etik Kurulumuzun 29 Aralık 2005 tarih ve 07/22/05 no.lu toplantısında 252 Protokol Numaralı Sağlık Bilimleri Enst.Müdürlüğü Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ertan ÇAKMAK'ın sorumlu olduğu, "Hepatit C virüsünün yapısal ve yapısal olmayan proteinlerinin prokaryotik ve memeli hücre hatlarında eksprese edilmesi, saflaştırılması ve viral patogenezdaki rollerinin araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur. Oy birliği ile karar verilmiştir. Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim. Prof.Dr.Taner ÇAMSARI Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu Başkanı	
--	--	---	--

Tel: 0232 412 22 54

8.2. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

TC Kimlik No / Pasaport No: 27287027162
Doğum Yılı: 11.06.1986
Yazışma Adresi : Doğanay Mah. 9114 sok. No : 16 D: 13 Yeşilyurt/İZMİR
Telefon : 02322564455 / 05556308140
e-posta : oztunaozge@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	De-rece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Mikrobiyoloji Ağırlıklı Biyoloji	Lisans	2008
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Mikrobiyoloji	Yüksek Lisans	2012

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Biyoloji
Tıbbi Mikrobiyoloji, Bakteriyoloji, Viroloji, Moleküler teknikler

YAYINLARI

Hakemli konferans / sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

1. ÖZTUNA Ö, ÖKTEM M, ABACIOĞLU H. Cloning and Expression of Hepatitis C Virus E1 envelope glycoprotein in <i>Escherichia coli</i>. MOLECULAR IMMUNOLOGY &IMMUNOGENETICS CONGRESS 2012. P 158 , 27-29 Nisan 2012 ,Antalya
--